

UNTERSUCHUNGEN ZUR INTESTINALEN
PYRIMIDIN- UND PURINRESORPTION
BEIM HUHN

Ludwig Stubenhofer

1982

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. E. Scharrer

UNTERSUCHUNGEN ZUR INTESTINALEN
PYRIMIDIN- UND PURINRESORPTION BEIM HUHN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
LUDWIG STUBENHOFER
aus
ARRACH

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan

Referent: Prof. Dr. E. Scharrer

Korreferent: Prof. Dr. J. Kösters



Tag der Promotion: 30. JULI 1982

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

<u>EINLEITUNG</u>	1
-------------------	---

<u>LITERATUR</u>	2
------------------	---

<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	6
------------------------------	---

Tiermaterial	6
--------------	---

Herstellung der Versuchslösungen	6
----------------------------------	---

Gewinnung des Versuchsmaterials	7
---------------------------------	---

Methodik der Darmsäckchenversuche	8
-----------------------------------	---

Berechnungen zu den Darmsäckchenversuchen	10
---	----

Methodik der Fluxversuche	11
---------------------------	----

Berechnungen zu den Fluxversuchen	14
-----------------------------------	----

Statistik	15
-----------	----

<u>ERGEBNISSE</u>	16
-------------------	----

Transport von ^3H -Uracil durch die Darmwand	16
---	----

Darmsäckchenversuche	16
----------------------	----

Fluxversuche	20
--------------	----

HPLC-Untersuchungen	24
---------------------	----

Transport von ^3H -markiertem Hypoxanthin bzw. von	27
---	----

Hypoxanthinmetaboliten durch die Darmwand	
---	--

Darmsäckchenversuche	27
----------------------	----

Fluxversuche	33
--------------	----

HPLC-Untersuchungen	40
---------------------	----

Transport von ^{14}C -markiertem Guanin bzw. von	43
---	----

Guaninmetaboliten durch die Darmwand	
--------------------------------------	--

Fluxversuche	43
--------------	----

HPLC-Untersuchungen	48
---------------------	----

Bestimmung der Pyrimidine und Purine im Harn	50
--	----

<u>DISKUSSION</u>	52
-------------------	----

Transport von Uracil durch die Darmwand	52
---	----

Transport von Hypoxanthin bzw. von Hypoxanthinmeta- boliten durch die Darmwand	54
---	----

Transport von Guanin bzw. von Guaninmetaboliten durch die Darmwand	56
---	----

<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	57
------------------------	----

<u>SUMMARY</u>	59
----------------	----

<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	61
-----------------------------	----

E I N L E I T U N G

Viele Nahrungsbausteine werden im Gastrointestinaltrakt nicht durch einfache Diffusion sondern durch aktive Transportsysteme des Darmepithels resorbiert. Bisher konzentrierten sich die Untersuchungen vor allem auf die Resorption von Zuckern und Aminosäuren, für die jeweils mehrere verschiedene Transportsysteme existieren. Für die Resorption der als Bausteine der Nucleinsäuren vorkommenden Purin- und Pyrimidinbasen gibt es ebenfalls ein spezielles intestinales Transportsystem, über das jedoch noch relativ wenig bekannt ist. Die Aufgabe dieser Arbeit war es, dieses Transportsystem beim Huhn näher zu untersuchen.

L I T E R A T U R

Der membranale Transport von Purinen und Pyrimidinen wurde bereits bei mehreren Tierarten untersucht. Transportsysteme für diese Basen wurden in verschiedenen Geweben nachgewiesen. In den Erythrozyten soll ein Transportsystem für Harnsäure existieren (LASSEN, 1961). Bekannt ist wohl die Rückresorption bzw. Sekretion der Harnsäure aus dem bzw. ins Tubuluslumen der Niere (MUDGE et al., 1973). So werden 95% der filtrierte Harnsäure beim Menschen aus dem Tubuluslumen rückresorbiert (MUDGE et al., 1973). In Nierenrindenschnitten von Ratten konnte zudem ein Transport von Hypoxanthin gegen ein Konzentrationsgefälle nachgewiesen werden. Für diesen Transport wurden aufgrund von kinetischen Untersuchungen zwei verschiedene Transportsysteme verantwortlich gemacht. Sie unterscheiden sich in ihren Km-Werten und scheinen auch andere Purine zu transportieren. Die betreffenden Autoren ziehen aus ihren Befunden den Schluß, daß Hypoxanthin bei physiologischen Spiegel von einem anderen System transportiert wird als Harnsäure und Xanthin (FOREMAN und SEGAL, 1979).

Die bisherigen Untersuchungen über den Transport von Purinen und Pyrimidinen konzentrierten sich aber mehr auf den Darm. Mit der everted-sac-Methode konnte am Jejunum des Schafes sowohl für Hypoxanthin als auch für Uracil ein deutlicher Transport gegen einen Konzentrationsgradienten nachgewiesen werden (SCHARRER et al., 1981). Der Hypoxanthintransport konnte durch hohe Konzentrationen von Uracil und auch Thymin gehemmt werden. Dieser Transportmechanismus besitzt hohe Substrataffinität und verfügt nur über eine niedrige Transportkapazität, was ganz allgemein beim Transport von Purin- und Pyrimidinbasen anzutreffen ist. Daß gerade das Schaf über einen ausgeprägten Transportmechanismus für diese Substanzen verfügt, kann nicht weiter erstaunen, da, bedingt durch die mikrobielle Verdauung im Vormagensystem der Wiederkäuer, erheblich mehr Nucleinsäuren in den Dünndarm gelangen als dies bei monogastrischen Tieren der Fall ist. Auch Ratte, Hamster und Frosch sind in der Lage Pyrimidinbasen, nämlich Uracil und Thymin entgegen einem Konzentrationsgradienten aus dem Darmlumen aufzunehmen (SCHANKER und TOCCO, 1961). Die Aufnahme gegen ein Konzentra-

tionsgefälle ist nur bei sehr niedrigen Konzentrationen nachweisbar und wird sehr schnell nicht mehr nachweisbar, wenn die Konzentrationen erhöht werden (SCHANKER und TOCCO, 1961). Purin- und Pyrimidinverbindungen hemmen sich beim intestinalen Transport gegenseitig, wenn sie jeweils in entsprechend höheren Konzentrationen dem Inkubationsmedium zugesetzt werden. Eine Hemmung kann auch noch durch andere Pyrimidinderivate erreicht werden, die von der Struktur gewisse Ähnlichkeiten aufweisen (SCHANKER et al., 1963). Versuche mit verschiedenen Substratkonzentrationen zeigten, daß Diffusion und aktiver Transport nebeneinander ablaufen. Bei niedrigen Konzentrationen erfolgt die Passage durch das Darmepithel vor allem durch aktiven Transport, bei höheren Konzentrationen überwiegt die Diffusion (SCHANKER und TOCCO, 1959). Ein aktiver intestinaler Transport von Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure konnte bei der Ratte mit der Darmsäckchenmethode nicht nachgewiesen, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden (SCHANKER et al., 1963). Unter Umständen ist die everted-sac-Methode (= Darmsäckchenmethode) nicht geeignet, sehr kleine Transportraten nachzuweisen. In anderen Untersuchungen mit der Darmsäckchenmethode beim Küken konnte kein aktiver intestinaler Transport von Xanthin nachgewiesen werden. Auch eine Akkumulation von Xanthin in der Darmepithelzelle konnte nicht gefunden werden. Es konnte aber unter den betreffenden Versuchsbedingungen vermehrt Harnsäure intrazellulär festgestellt werden, was für die intrazelluläre Umwandlung von Xanthin in Harnsäure spricht (TAUBE und BERLIN, 1970). Die Bildung von Harnsäure konnte zudem durch eine Hemmung der Xanthinaufnahme vermindert werden. Die Aufnahme von Xanthin in das Darmepithel war beim Küken bereits zwei Tage vor dem Schlüpfen nachweisbar; dabei dürfte es sich aber um keinen aktiven Transport handeln. Der Darm kann aber auch als Ausscheidungsorgan für Purine benutzt werden. So werden ein Drittel der menschlichen Harnsäure über den Darm ausgeschieden. In der umgekehrten Richtung scheint der Darm des Menschen allerdings für Harnsäure relativ dicht zu sein (SAUNDERS und BECK, 1965). Auch beim Hund scheint die Ausscheidung von Harnsäure über den Darm von einiger Wichtigkeit zu sein (KNAROWSKI et al., 1963). Seltsamerweise wird berichtet, daß beim Dalmatiner die Harnsäureausscheidung über

den Darm kaum eine Rolle spielt (GAEBLER, 1981). Eigentlich wäre eher das Gegenteil zu erwarten, da der Dalmatiner im Gegensatz zu anderen Hunderassen nur die Hälfte seiner Harnsäure zu Allantoin umwandeln kann. Für die Ausscheidung der Harnsäure in den Darm wird beim Hund erleichterte Diffusion in Betracht gezogen, da die Höhe der Ausscheidung dem Blutspiegel nicht direkt proportional ist, wenngleich bei einem höheren Blutspiegel mehr Harnsäure über den Darm ausgeschieden wird (KNAOWSKI et al., 1963). Die Ergebnisse wurden am lebenden Tier mit einer Perfusionsmethode gewonnen. Der genaue Ausscheidungsmodus ist allerdings noch unklar.

Die Angaben über die Harnsäureausscheidung des Hamsters gehen auseinander. KHAN et al. (1975) konnten keinen aktiven Transport von Harnsäure, Xanthin und Hypoxanthin am Dünndarm von Ratte und Hamster demonstrieren. Auch anaerobe Verhältnisse veränderten die betreffenden Ergebnisse nicht (KHAN et al., 1975). OH et al. (1966) fanden, daß Harnsäure durch das Dünndarmepithel der Ratte mittels Diffusion ins Darmlumen geschleust wird. Die transportierte Harnsäuremenge war der Konzentration direkt proportional. BERLIN und HAWKINS (1968a, 1968b) wiederum fanden beim Jejunum des Hamsters eine Sekretion von Harnsäure, Hypoxanthin und Xanthin, wobei die beiden letzteren Substrate wesentlich rascher transportiert wurden. Sie konnten außerdem Einzelheiten des Transportes an den Zellmembranen von Darmepithelzellen beschreiben. Der Flux vom Lumen in Richtung Blut machte nur ein Drittel des Fluxes in der umgekehrten Richtung aus. Dieser Flux nahm mit steigenden Konzentrationen weiter zu, wenngleich die Zunahme ab einer bestimmten Konzentration kleiner wurde (BERLIN und HAWKINS, 1968a, 1968b). KOLASSA et al. (1980) berichten Ähnliches vom Meerschweinchendarm. Sie untersuchten den Xanthin- und Hypoxanthintransport und konnten ebenfalls eine Sekretion dieser Substrate ins Darmlumen feststellen. Die untersuchten Substanzen erschienen generell auf der Lumenseite fast ausschließlich als Harnsäure.

Insgesamt kann man sagen, daß die Informationen über den Transport von Purinen und Pyrimidinen durch die Darmwand noch spärlich sind. Insbesondere scheint es große Unterschiede zwischen einzelnen Species zu geben.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Hinblick auf die Besonder-

heiten des Purinstoffwechsels beim Vogel der intestinale Transport und Stoffwechsel von Pyrimidin- (Uracil) und Purinbasen (Hypoxanthin und Guanin) untersucht. Dabei fanden zwei in vitro-Verfahren Verwendung, nämlich die von WILSON und WISEMAN (1954) entwickelte everted-sac-Methode (= Darmsäckchenmethode) sowie eine von BINDL (1980) zur Bestimmung unidirektionaler transepithelialer Nährstofffluxe entwickelte Methode.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Tiermaterial

Das Tiermaterial war relativ unterschiedlich. Dies ergab sich aus der Tatsache, daß z. T. überzählige Tiere aus anderen Versuchen verwendet werden mußten.

Bei den "Darmsäckchenversuchen" wurden mit Ausnahme der Uracil-Versuche (Uracil-Konzentration: 0,05 mmol/l), bei denen männliche und weibliche Tiere zur Verfügung standen, nur männliche Tiere verwendet. Ansonsten wurde im einzelnen nicht nach Geschlecht differenziert. Es wurden in etwa gleich viel männliche und weibliche Tiere verwendet.

Bei den "Darmsäckchenversuchen" wurden ausschließlich Küken der Rasse "Weißes Leghorn" verwendet. Bei den "Fluxversuchen" gehörten die meisten Tiere der Rasse "Italiener" an, ein kleinerer Anteil, etwa 20%, gehörte der Rasse "weißes Leghorn" an. Größere rassenspezifische Unterschiede in der Resorption der untersuchten Substanzen konnten nicht festgestellt werden. Das Alter der Tiere lag bei den Darmsäckchenversuchen bei 3 bis 6 Wochen, das Gewicht bei durchschnittlich 400 g. Bei den Fluxversuchen (BINDL, 1980) war das Alter der Tiere nicht genau bekannt. Die Gewichtsverteilung war sehr viel uneinheitlicher und lag zwischen etwa 700 bis 2400 g. Die Tiere wurden zu mehreren in Drahtkäfigen gehalten. Sie hatten freien Zugang zum Wasser und wurden ad libitum mit einem Alleinfutter gefüttert.

Herstellung der Versuchslösungen

Die für die Transportstudien verwendeten Substanzen (Hypoxanthin, Uracil, Guanin) wurden in Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) gelöst.

Die Pyrimidinbasen und v. a. die Purinbasen lösten sich relativ schlecht in Wasser. Sie konnten nur bei basischem pH gelöst werden. Wenige ml Puffer wurden stark basisch gemacht, bis die Base sich gelöst hatte, und dann wurde sofort mit normalem Puffer verdünnt. Der pH-Wert mußte erneut auf den oben erwähnten Bereich eingestellt werden. Es wurde immer eine Stammlösung hergestellt mit einer Purin-Konzentration

von 1 mmol/l oder 0,1 mmol/l. Von dieser wurden die entsprechenden Versuchslösungen durch Verdünnung hergestellt. Untersuchungen mit der HPLC-Technik (High performance Liquid Chromatography; FLEMEYER et al., 1982) zeigten, daß der Lösungsvorgang bei basischem pH-Wert die gelösten Substanzen nicht verändert hatte. Je nach Versuchsbedingungen wurden zur Versuchslösung die radioaktiv markierten Substrate gegeben. Hypoxanthin und Uracil waren ^3H -markiert, Guanin war ^{14}C -markiert. Nur der Spritzeninhalt bei den Fluxversuchen (s. u.) war nicht markiert.

Gewinnung des Versuchsmaterials

Die Tiere wurden durch einen Schlag auf den Kopf betäubt. Um eine sichere Tötung der Tiere zu gewährleisten, wurden die Tiere anschließend decapitiert. Dann wurden, der besseren Übersichtlichkeit wegen, die Federn im Bereich des Bauches abgerupft, die Bauchhöhle mit der Schere eröffnet, die entsprechenden Darmabschnitte entnommen und sofort in eine Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung gegeben. Bei den Fluxversuchen wurden danach die einzelnen Darmabschnitte entlang des Gekröses aufgeschnitten, bei den Darmsäckchenversuchen wurden sie mit Hilfe eines Hundeharnkatheters umgestülpt, sodaß die Darminnenseite außen zu liegen kam. Dann wurde der Darm grob mit den Fingern gesäubert, in Krebs-Henseleit-Puffer abgespült und anschließend in kalten (4°C) Krebs-Henseleit-Puffer gegeben. Dieser wurde während der Präparation ständig mit Carbogen ($\text{O}_2/\text{CO}_2 = 95/5$) begast.

Methodik der Darmsäckchenversuche

Man entnimmt ein etwa 4 bis 5 cm langes umgestülptes Darmstück und bindet es an einem Ende mit chirurgischer Nähseide zu. Durch das andere Ende führt man eine Anopfkannüle ein, auf die eine Plastikspritze aufgesetzt ist. Der Darm wird samt Anopfkannüle mit Daumen und Zeigefinger festgehalten, sodaß beim Injizieren der Versuchslösung diese nicht wieder durch das offene Ende ausfließen kann. Man injiziert 0,5 ml Versuchslösung. Dieses sogenannte seröse Medium ist radioaktiv markiert und entspricht zu Beginn des Versuches in seiner Zusammensetzung dem mucösen Medium. Der Inhalt wird dann etwas unter Spannung gesetzt und auch das zweite Ende zugebunden. Dies soll den immer festzustellenden Wassereinstrom in das Darmsäckchen in Grenzen halten. Daraufhin mißt man die Länge des Säckchens und bestimmt dessen Gewicht. Das Darmsäckchen wird nun in einen 50 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben. Dieser enthält 10 ml Versuchslösung, das sogenannte mucöse Medium, das bereits vorher mit Carbogen ($O_2/CO_2 = 95/5$) begast worden ist. Man gibt nun das Säckchen in den Kolben. Es folgt eine erneute kurze Be-gasung. Die Inkubation beginnt sofort. Es findet keine Vorinkubation statt. Die Temperatur des Wasserbades betrug $38,5^\circ C$. Die Kolben wurden dabei mit einer Frequenz von 120 Oszillationen pro Minute geschüttelt.

Nach 45 Minuten Inkubation wird das Darmsäckchen aus dem Erlenmeyer-Kolben entnommen, leicht auf Zellstoff abgetupft, gewogen und über einem Glasschälchen mit der Schere aufgeschnitten. Man wiegt das Glasschälchen samt serösem Inhalt, um die Menge des serösen Mediums zu bestimmen. Das Gewicht des Glasschälchens ist durch vorherige Wiegung bekannt. Dann werden je 0,2 ml seröses und mucöses Medium in ein Reagenzglas pipettiert, mit je 0,2 ml 0,65 n Perchlorsäure zur Enteiweißung versetzt und bei 4000 Umdrehungen 10 Minuten lang zentrifugiert. Vom Überstand pipettiert man 0,2 ml in ein Zählfläschchen und gibt 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve; Koch-Light-Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks, England) dazu. Anschließend werden die Proben in einem Szintillationszähler (Packard Tricarb Scintillation Spectrometer, Modell 3385) jeweils 10 Minuten pro Probe gezählt. Man schneidet nach der

Entleerung des Darmsäckchen an den Abbindestellen durch. Der Teil, der zwischen den Abbindestellen liegt und folglich an der Resorption beteiligt ist, wird auf ein Stückchen Aluminiumfolie gelegt, 12 Stunden bei 100 °C getrocknet und dann gewogen. Das Gewicht der Aluminiumfolie ist wiederum bekannt, so daß aus der Differenz das Darmtrockengewicht bestimmt werden kann.

Berechnungen zu den Darmsäckchenversuchen

I. Konzentration im serösen und mucösen Medium (nach der Inkubation)

$$X = \frac{M_1 \cdot C}{M_0}$$

X = Konzentration des serösen bzw. mucösen Mediums

M₁ = Zählwert der Radioaktivität der gemessenen Probe

M₀ = Zählwert der Radioaktivität der Versuchslösung

II. Konzentrationsgradient: s/m

Seröse (s) und mucöse (m) Konzentration werden ins Verhältnis gesetzt. Ist die Konzentration im serösen Medium größer als im mucösen Medium, kann von aktivem Transport gesprochen werden. Der Konzentrationsgradient ist dann > 1.

Methodik der Fluxversuche

Eine 1 ml Spritze wird mit dem Konus nach oben auf den Hals eines umgedrehten Glastrichters gesteckt. Über den Konus der Spritze legt man ein etwa 2 x 2 cm großes, mit Krebs-Henseleit-Puffer befeuchtetes Stückchen Nylon-netz (Elbeo 22dtx/20den). Dann schneidet man mit der Schere ein etwa 2 cm langes Darmstückchen ab und legt es ebenfalls über den Spritzenkonus. Je nachdem, ob es sich um die Bestimmung der muco-serösen ¹⁾ oder sero-mucösen Fluxe ²⁾ handelt, ist entweder die seröse oder die mucöse Seite der Darmwand nach oben gerichtet. Auf halber Höhe des Spritzenkonus ist eine Rille eingefräst. Auf eine abgeschnittene Eppendorf-Pipettenspitze schiebt man von der Spitze her einen Gummiring bis zum vorderen abgeschnittenen Rand auf. Der Gummiring wird dabei gedehnt. Diese Pipettenspitze wird nun mit dem Gummi voraus etwas über den Spitzenkonus und das dazwischen liegende Darmstückchen geschoben. Dann wird der Gummi über den Rand der Pipettenspitze geschoben, sodaß er von der Pipettenspitze in die Rille des Spritzenkonus gleiten kann. Dabei wird der Darm fest zwischen Rille und Gummi eingeklemmt, so daß beim Versuch mucöses ³⁾ und seröses ⁴⁾ Medium durch den Darm voneinander getrennt sind. Anschließend nimmt man die Spritze vom Glastrichter ab und dreht sie um. Überstehende Darmteile und Nylonnetzreste werden mit der Schere abgeschnitten. Die Spritze wird dann in ein Gläschen (= 20 ml Szintillationsfläschchen) mit 7 ml Krebs-Henseleit-Puffer gesteckt. Die Temperatur des Wasserbades beträgt 40°C. Dieses Gläschen wird durch einen sehr dünnen Silikonschlauch mit Carbogen begast. Man gibt nun 0,5 ml Krebs-Henseleit-Puffer in die Spritze, sodaß der Flüssigkeitspegel in der Spritze und im Gläschen gleich hoch ist und damit hydrostatische Druckunterschiede wegfallen. Die Versuchsanordnung ist in Abb. 1 dargestellt. Die Versuchsanordnung war für 12 Versuche ausgelegt. Pro Darmabschnitt wurden normalerweise je 3 "muco-seröse" und 3 "sero-mucöse" Präparate hergestellt. Es folgte nun eine Vor-

- 1) von der mucösen zur serösen Seite der Darmwand gerichtet
- 2) von der serösen zur mucösen Seite der Darmwand gerichtet
- 3) = das die mucöse Seite des Darms bespülende Inkubationsmedium
- 4) = das die seröse Seite des Darms bespülende Inkubationsmedium

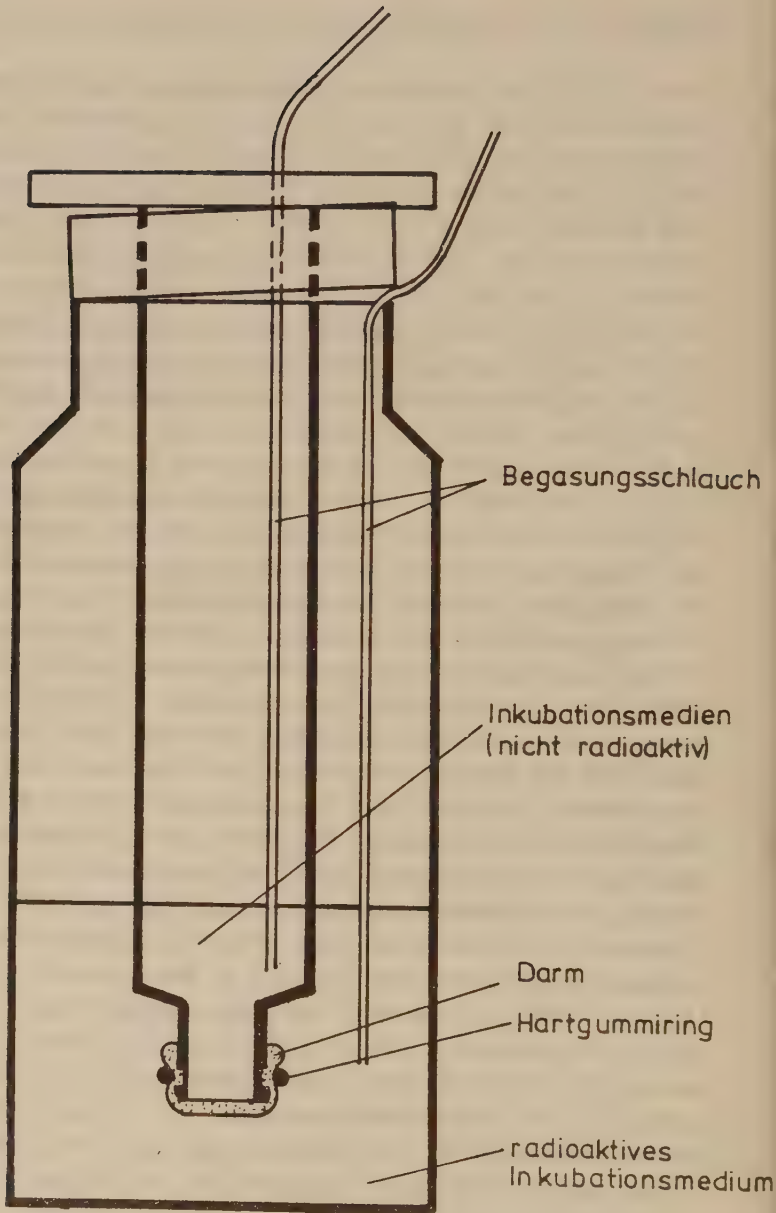


Abb. 1 : Inkubationsansatz für die Bestimmung der unidirektionalen Fluxe.

Inkubation von etwa 15 Minuten. Danach nimmt man die Spritze aus dem Gläschen, entleert den Spritzeninhalt durch Kippen der Spritze und setzt die Spritze in ein anderes Gläschen um, das 7 ml Versuchslösung mit dem radioaktiv markiertem Substrat enthält. Auch dieses Gläschen wird während des ganzen nun folgenden Versuchs mit Carbogen begast. In die Spritze werden 0,5 ml Versuchslösung pipettiert, die die gleiche Konzentration des in diesem Fall aber nicht radioaktiv markierten Substrats aufweist wie der Gläscheninhalt. Das Umsetzen in die radioaktiv markierte Lösung ist mit dem eigentlichen Versuchsbeginn gleich zu setzen. Alle 10 Minuten pipettiert man nun 0,1 ml aus der Spritze in ein Zählfläschchen und gibt 10 ml Szintillationsflüssigkeit dazu. Die Proben werden später in einem Flüssigkeitsszintillationszähler 10 Minuten gezählt. Die Begasung muß für die Dauer der Probenentnahme abgeschaltet werden, um Luftblasen beim Pipettiervorgang zu vermeiden. Die entnommenen 0,1 ml werden durch 0,1 ml nicht markierter Versuchslösung ersetzt. Insgesamt wurden 10 Proben entnommen. Die Dauer der Inkubation betrug somit 100 Minuten.

Berechnungen zu den Fluxversuchen

- I. Berechnung des muco-serösen (= ms) bzw. sero-mucösen (= sm) Fluxes (z. B. Flux zwischen der 40. und 50. min).

$$F_{50} = \frac{P_{50} \times M}{V \times Fl} - \frac{4}{5} \frac{P_{40} \times M}{V \times Fl} \quad 1)$$

F_{50} = muco-seröser bzw. sero-mucöser Flux zwischen der 40. und 50. min in nmol/cm².

P_{50} = Radioaktivität der aus dem Spritzeninhalt 50 min nach Versuchsbeginn entnommenen Probe (0,1 ml).

P_{40} = Radioaktivität der aus dem Spritzeninhalt 40 min nach Versuchsbeginn entnommenen Probe (0,1 ml).

V = Radioaktivität der Versuchslösung (0,1 ml).

M = Substratmenge im Spritzeninhalt zu Beginn des Versuches.

Fl = Fläche der Spritzenöffnung (0,096 cm²).

- 1) Bei F_{10} (Flux zwischen Versuchsbeginn und 10. min) ergibt sich natürlich für den 2. Term der Gleichung der Wert 0.

II. Berechnung des Nettofluxes

Aus den am Darm des gleichen Tieres parallel bestimmten muco-serösen bzw. sero-mucösen Fluxen wurden die Mittelwerte gebildet. Der Mittelwert der sero-mucösen Fluxen wurde dann vom Mittelwert der muco-serösen Fluxen abgezogen. Dies ergab den sogenannten Nettoflux.

Die Mittelwerte der Nettofluxe sind im Ergebnisteil als Säulen dargestellt. Die Stundenwerte sind durch Addition der letzten sechs 10 min Werte errechnet worden, da diese Werte bereits unter steady state-Bedingungen gewonnen wurden.

Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf Signifikanz geprüft.

ERGEBNISSE

Transport von ^3H -Uracil durch die Darmwand

Der Transport von ^3H -markiertem Uracil durch die Darmwand des Huhnes wurde mit zwei Versuchsanordnungen (Darmsäckchenmethode bzw. Fluxversuch) an vier Darmabschnitten untersucht, nämlich am proximalen und distalen Jejunum sowie am Colon und am Caecum. Nach der Inkubation wurde mit der HPLC-Technik untersucht, inwieweit die ^3H -Aktivität noch an das Uracil gebunden war (Tab. 1 und 2).

Darmsäckchenversuche

Mit der von WILSON und WISEMAN (1954) entwickelten everted-sac-Technik (= Darmsäckchenmethode) wurden das distale Jejunum, das Colon und das Caecum untersucht. Bei einer Uracil-Konzentration des Inkubationsmediums von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ergab sich für das distale Jejunum und das Colon, wie Abb. 2 zeigt, ein deutlicher, von der mucösen zur serösen Seite der Darmwand gerichteter, Transport gegen ein Konzentrationsgefälle. Für das Caecum war dies nicht der Fall (Abb. 3). Eine deutliche Hemmung des Uraciltransports durch Hypoxanthin konnte mit der Darmsäckchenmethode für das distale Jejunum und das Colon festgestellt werden (Abb. 3). Dieser Befund deutet auf eine Konkurrenz um das gleiche intestinale Transportsystem zwischen Uracil und Hypoxanthin hin. Bei den Hemmversuchen betrug die Konzentration des Uracils $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hypoxanthin (unmarkiert) lag hundertfach höher konzentriert vor.

In den genannten Abbildungen sind lediglich die Uracilkonzentrationen des mucösen (= m) und serösen (= s) Mediums zu Beginn und am Ende der Inkubation dargestellt. Ein Anstieg der Substratkonzentration des serösen Mediums über die Ausgangskonzentration hinaus manifestiert sich in einem s/m-Gradienten > 1 und deutet auf das Vorhandensein eines aktiven transepithelialen Transports hin. Es wurde zusätzlich auch die während der Inkubation in das seröse Medium gegen ein Konzentrationsgefälle transportierte Substratmenge berechnet und auf gleiches Darmtrockengewicht bezogen. Die dabei erhaltenen Werte werden

nicht im einzelnen aufgeführt, da sich das gleiche Bild ergab, wie es sich in den Abbildungen darstellt. Analoges gilt für die entsprechenden Versuche mit ^3H -markiertem Hypoxanthin.

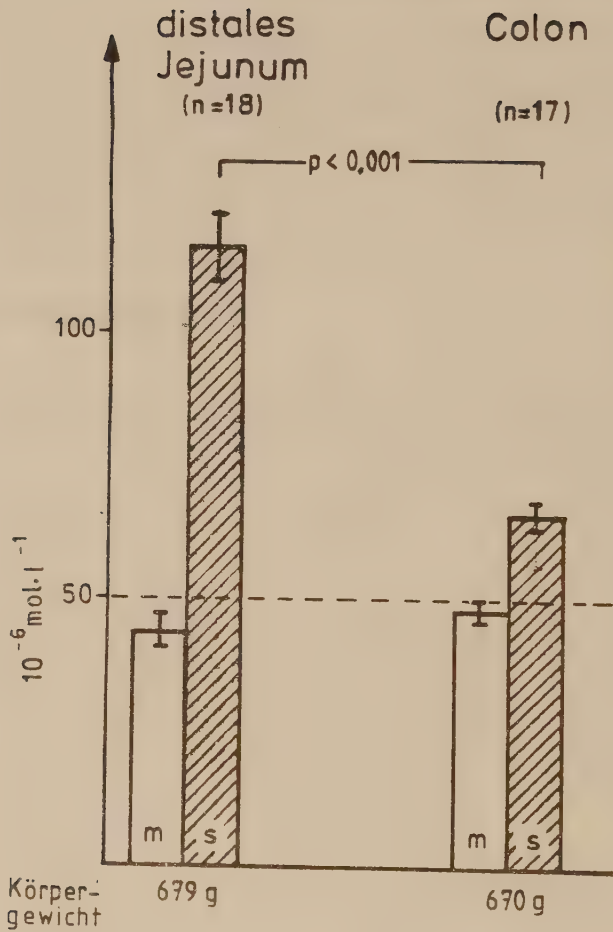


Abb. 2: Uracilkonzentration des mucösen (m) und serösen (s) Mediums umgestülpter Darmsäcke nach einer Inkubation von 45 min. Ausgangskonzentration des Inkubationsmediums: $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

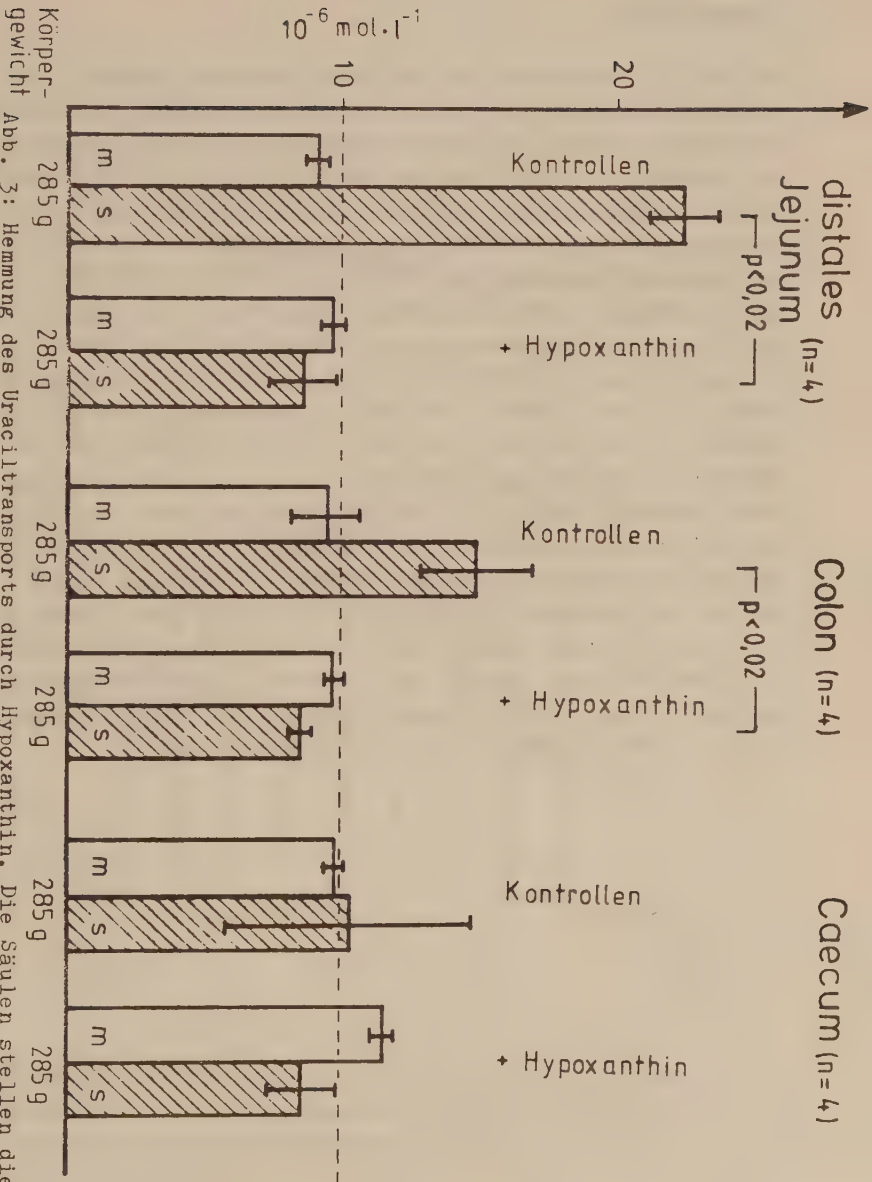
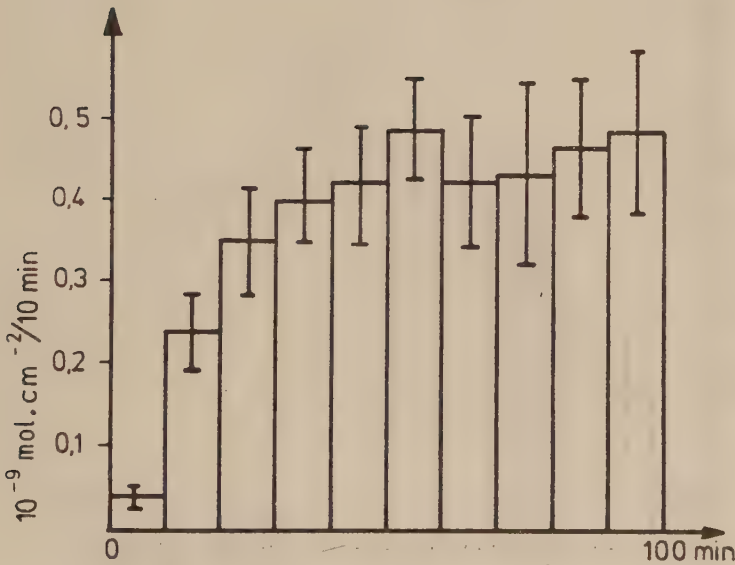


Abb. 3: Hemmung des Uraciltransports durch Hypoxanthin. Die Säulen stellen die Uracil-konzentration des mucösen (m) und serösen (s) Mediums umgestülpter Barmäcke nach einer Inkubation von 45 min dar. Ausgangskonzentration für Uracil: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hypoxanthinkonzentration bei den Hemmversuchen: $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

Fluxversuche

Bei den Fluxversuchen, für die das proximale Jejunum, das distale Jejunum und das Colon verwendet wurden, überwogen die muco-serösen Fluxe die sero-mucösen Fluxe um ein Vielfaches. Es ergaben sich daher muco-seröse Nettofluxe. Wie die Abbildungen 4 und 5 zeigen, waren für die Nettofluxe etwa 40 min nach Versuchsbeginn steady state-Bedingungen erreicht. Für das proximale Jejunum ergab sich ein ähnlicher Zeitverlauf, der allerdings nicht dargestellt ist. Die in der Abb. 6 dargestellten unidirektionalen und Netto-Fluxe, die während der letzten 60 min der Versuche erhalten wurden, repräsentieren daher die unter steady state-Bedingungen erhaltenen Fluxe. Aus Abb. 6 geht hervor, daß sich für die unidirektionalen und Netto-Fluxe am distalen Jejunum und am Colon etwa gleiche Werte ergaben, während die muco-serösen und damit auch die Netto-Fluxe am proximalen Jejunum kleiner ($p < 0,002$) waren. Bei den Darmsäckchenversuchen wurden, wie bereits erwähnt, für den Netto-Uraciltransport am distalen Jejunum höhere Werte erhalten als am Colon, während dies bei den Fluxversuchen nicht der Fall war (vergl. Abb. 2 und 6). Diese Diskrepanz mag mit dem unterschiedlichen Körpergewicht der jeweiligen Versuchstiere zusammenhängen (vergl. Abb. 2 und 6)

distales
Jejunum (n=6)



Körpergewicht

1918 g

Abb. 4: Zeitabhängigkeit des von der mucösen zur serösen Seite des distalen Jejunums erfolgenden Nettofluxes von ^3H -Uracil. Uracilkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

Colon (n=6)

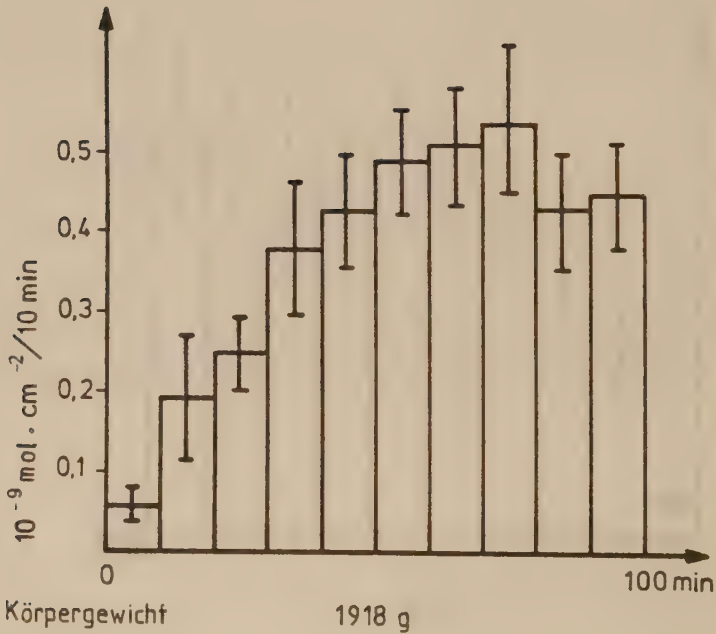


Abb. 5: Zeitabhängigkeit des von der mucösen zur serösen Seite des Colons erfolgenden Nettofluxes von ^3H -Uracil. Uracilkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
n = Anzahl der Tiere.

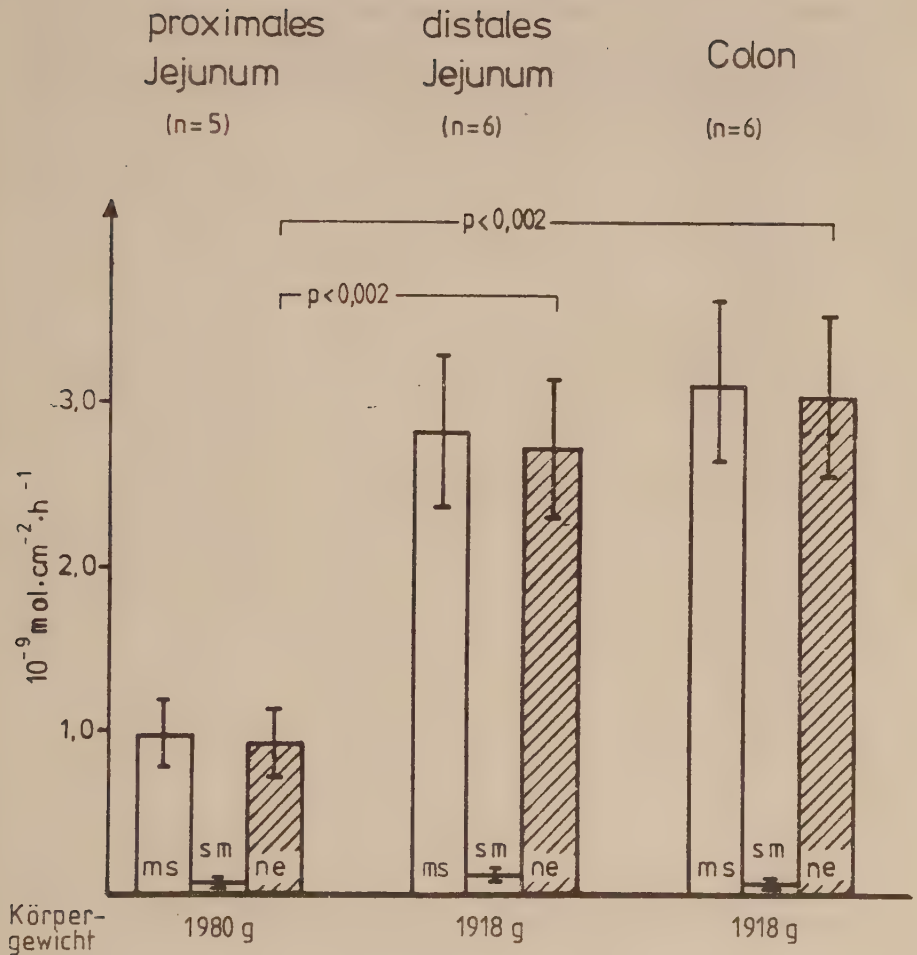


Abb. 6: Unidirektionale und Netto-Fluxe von ^3H -Uracil durch die Darmwand. Uracilkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere. (ms = muco-seröser Flux; sm = sero-mucöser Flux; ne = Nettoflux = ms - sm).

HPLC-Untersuchungen

Die Radioaktivität des Inkubationsmediums war vor der Inkubation zu etwa 70% an Uracil gebunden. Dieser Prozentsatz veränderte sich bei beiden Versuchsmethoden weder im mucösen noch im serösen Medium im Verlauf der Inkubation wesentlich (Tab. 1 und 2). Uracil wird also anscheinend vom Darm in keinem nennenswerten Umfang verstoffwechselt.

Tabelle 1: Verteilung der ^3H -Aktivität des Inkubationsmediums nach der Inkubation von Darmsäckchen mit ^3H -markiertem Uracil. Uracilkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Angaben in %.

	distales Jejunum		Colon		Caecum		Versuchs- lösung
Einspritzpeak ¹⁾	18,0	35,6	24,6	37,9	29,6	33,9	30,0
Uracil	78,2	60,6	69,6	58,5	64,9	61,8	70,0
	seröses Medium	muköses Medium	seröses Medium	muköses Medium	seröses Medium	muköses Medium	

¹⁾ Bei der ^3H -Aktivität des Einspritzpeaks handelt es sich höchstwahrscheinlich um ^3H -markiertes Wasser.

Tabelle 2: Verteilung der ^3H -Aktivität des Inkubationsmediums am Versuchsende bei den Fluxversuchen mit ^3H -markiertem Uracil. Uracilkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Angaben in %.

	proximales Jejunum		distales Jejunum		Colon		
Einspritzpeak	35,3	33,2	48,2	32,4	18,7	35,8	30,0
Uracil	60,1	62,5	44,5	63,8	76,4	60,8	70,0
	Spritze (seröses Medium)	Gläschen (muköses Medium)	Spritze (seröses Medium)	Gläschen (muköses Medium)	Spritze (seröses Medium)	Gläschen (muköses Medium)	Versuchslösung

Transport von ^3H -markiertem Hypoxanthin bzw. von Hypoxanthin-metaboliten durch die Darmwand

Der Transport von ^3H -markiertem Hypoxanthin (markiert an Position C2 und C8) bzw. dessen Metabolite durch die Darmwand des Mähnes wurde mit zwei Versuchsanordnungen (Darmsäckchenmethode bzw. Fluxversuche) an sieben verschiedenen Abschnitten des Verdauungstrakts (Kropf, Duodenum, proximales Jejunum, distales Jejunum, Colon, Caecum und Kloake) untersucht. Des Weiteren wurde mit der HPLC-Technik geprüft, zu welchen Metaboliten Hypoxanthin beim Transport durch die Darmwand umgesetzt wird.

Darmsäckchenversuche

Die Darmsäckchenversuche fanden bei drei verschiedenen Hypoxanthinkonzentrationen statt. Bei einer Hypoxanthin-Konzentration von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ergab sich weder für das distale Jejunum noch für das Colon ein Transport von der mucösen (m) zur serösen (s) Seite gegen ein Konzentrationsgefälle (Abb. 7). Bei einer Konzentration von $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zeichnete sich für das Duodenum und das proximale Jejunum ein s/m Gradient > 1 ab, während dies für das distale Jejunum, das Colon, das Caecum und die Kloake nicht der Fall war (Abb. 8). Bei einer Konzentration von $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ergab sich sowohl für das proximale als auch das distale Jejunum ein s/m Gradient > 1 , während dies für das Colon und das Caecum nicht zutraf. Beim proximalen und distalen Jejunum wurden die s/m Gradienten somit mit fallender Substrat-Konzentration größer. Die zugegebene Radioaktivität blieb unabhängig von der Konzentration immer gleich, sodaß bei der höheren Substrat-Konzentration wesentlich mehr Substrat transportiert werden mußte, um den gleichen Gradienten zu erzeugen wie bei einer niedrigeren Substrat-Konzentration. Für das Colon konnte bei keiner Konzentration ein s/m Gradient > 1 festgestellt werden. Dies muß aber aktive Transportvorgänge nicht unbedingt ausschließen. Bei Darmsäckchenversuchen ist immer mit einem gewissen Wassereinstrom in das seröse Medium des Säckchens zu rechnen. So ergibt sich z. B. für Inulin, das die Darmwand nur sehr schlecht

passieren kann, ein Gradient, der etwa bei 0,9 liegt, da das Inulin dem Wasser nicht entsprechend schnell nachfolgen kann und deshalb der Säckcheninhalt durch den Wassereinstrom verdünnt wird. Bei zwei anderen Substanzen, nämlich Anilin und m-Nitrophenol ergibt sich ein Gradient von etwa 1, da diese Verbindungen die Darmwand sehr leicht mittels Diffusion durchdringen können (SCHANKER und TOCCO, 1961). Tatsächlich konnte bei den Hemmversuchen mit Uracil der s/m Gradient des Colons leicht erniedrigt werden, während sich beim Caecum keine Veränderung des Gradienten nachweisen ließ (Abb. 10). Am deutlichsten ($p < 0,02$) war die Hemmwirkung von Uracil beim distalen Jejunum, wo aus einem Gradienten > 1 ein Gradient < 1 wurde (Abb. 10). Bei den Hemmversuchen betrug die Konzentration des Hypoxanthins $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Uracil (unmarkiert) lag hundertfach höher konzentriert vor. Die Hemmwirkung von Uracil auf den ^3H -Hypoxanthin-Transport deutet auf eine Interaktion zwischen dem intestinalen Pyrimidin- und Purintransport hin.

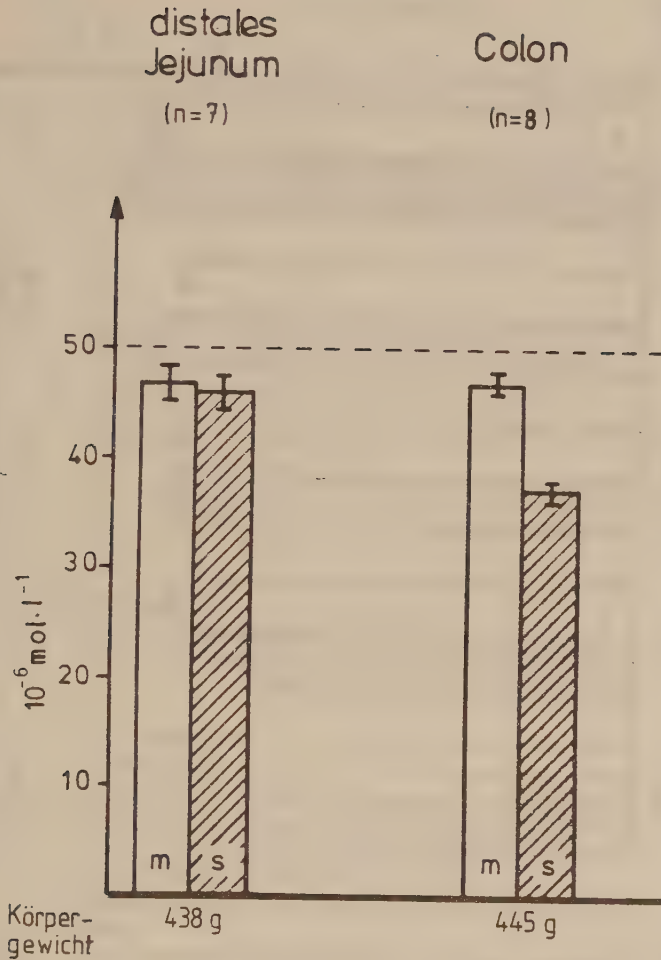


Abb. 7: Konzentration der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) des mucösen (m) und serösen (s) Mediums umgestülpter Darmsäcke bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium nach einer Inkubation von 45 min. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.
n = Anzahl der Tiere.

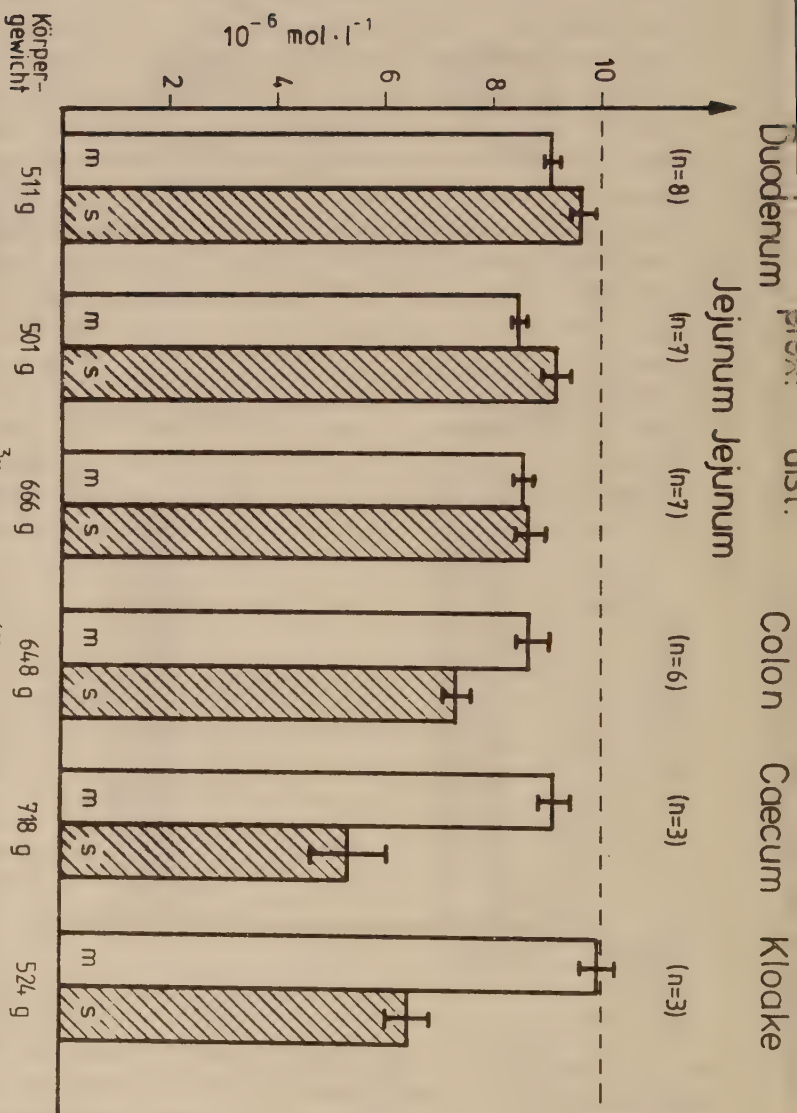


Abb. 8: Konzentration der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) des mucösen (m) und serösen (s) Mediums umgestülpter Darmsäcke bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium nach einer Inkubation von 45 min. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

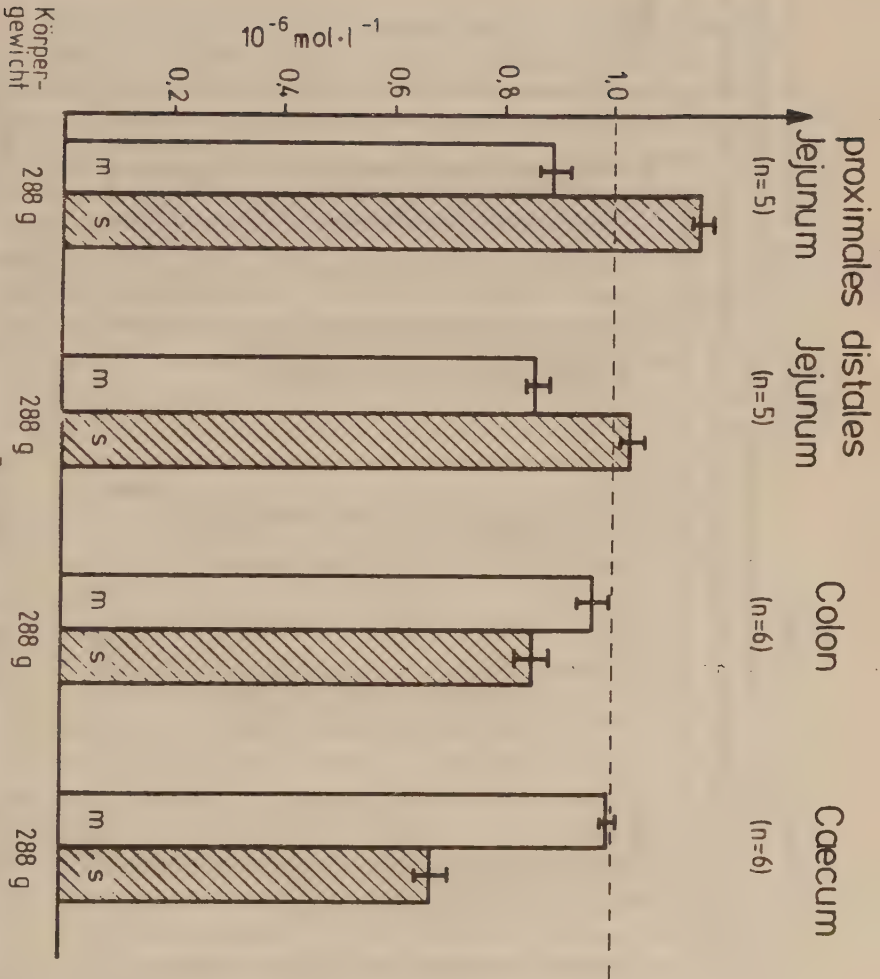


Abb. 9: Konzentration der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) des mucösen (m) und serösen (s) Mediums umgestülpter Darmsäcke bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium nach einer Inkubation von 45 min. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

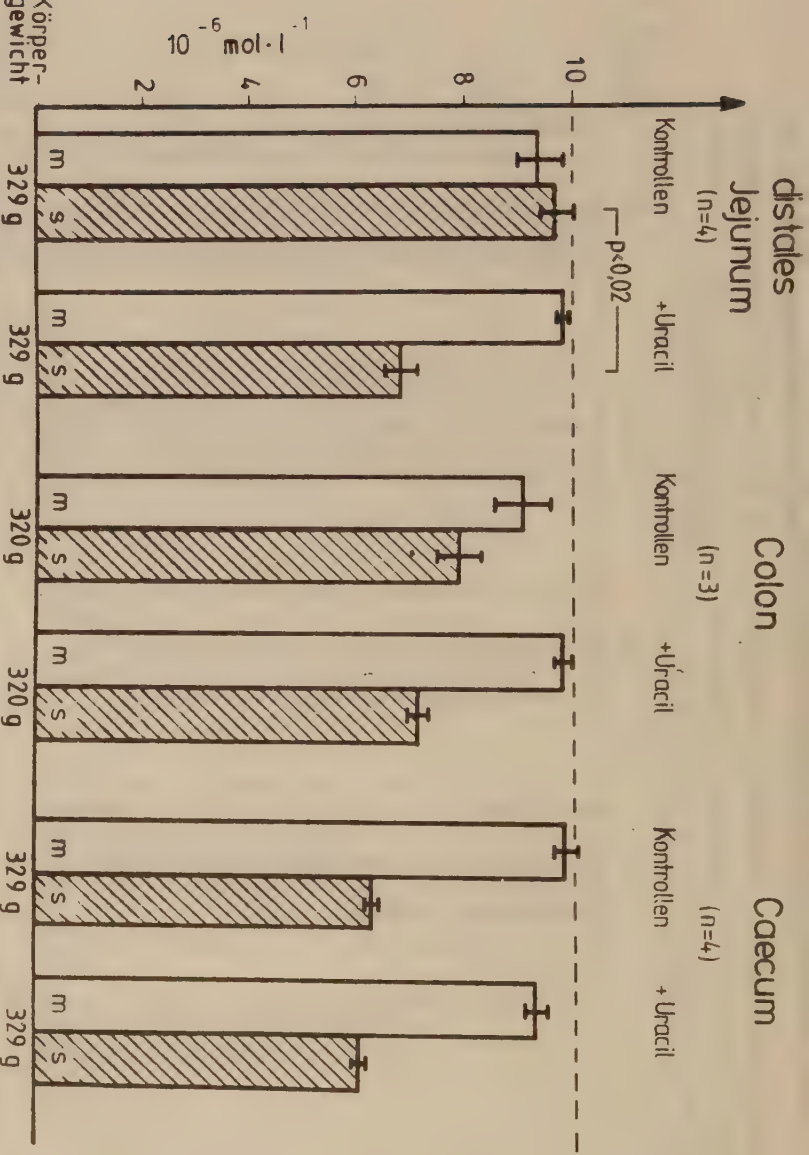


Abb. 10: Konzentration der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) des mucösen (m) und serösen (s) Mediums umgestülpter Darmsäcke bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium nach einer Inkubation von 45 min. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Urackonzentration bei den Hemmversuchen: $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

Fluxversuche

Bei den Fluxversuchen überwogen sowohl beim distalen Jejunum als auch beim Colon die muco-serösen Fluxe die sero-mucösen Fluxe deutlich. Ab etwa 20 min stellte sich ein Gleichgewicht ein. Die Transportraten blieben ab diesem Zeitpunkt in etwa gleich (Abb. 11). Dies zeigt zum einen, daß ein Gradient < 1 bei den Darmsäckchenversuchen einen transepithelialen Netto-Transport nicht unbedingt ausschließt, zum anderen, daß die Fluxmethode anscheinend besser geeignet ist, kleine Netto-Transportraten nachzuweisen. Die Transportraten zeigen zudem eine gewisse Abhängigkeit von der Gewichtsentwicklung der Tiere (Abb. 12). Es stiegen aber nicht nur die Nettofluxe mit dem Gewicht der Tiere an, sondern auch die sero-mucösen Fluxe. Dies könnte damit erklärt werden, daß bei größeren Tieren möglicherweise die Darmschleimhaut, bezogen auf 1 cm^2 Makrofläche, eine größere resorbierende Oberfläche hat. Kleinere Netto-Transportraten konnten auch für das proximale Jejunum und das Caecum nachgewiesen werden, während bei der Kloake und beim Kropf keinerlei Unterschied zwischen den muco-serösen und den sero-mucösen Fluxen festgestellt werden konnte (Abb. 13). Wird das Natrium des Krebs-Henseleit-Puffers durch Kalium ersetzt, dann werden sowohl die Nettofluxe als auch die sero-mucösen Fluxe kleiner. Die Abnahme ist allerdings relativ gering, so daß nicht unbedingt auf eine Natriumabhängigkeit des Transports geschlossen werden kann (Abb. 14). Die Abnahme der sero-mucösen Fluxe könnte unter Umständen auch eine Kaliumwirkung sein. Kalium kann durch Erniedrigung des Membranpotentials die Zellen zum Anschwellen bringen und damit die interepithelialen Spalten verengen, durch die der sero-mucöse Flux zum Teil erfolgen dürfte (BERLIN and HAWKINS, 1968). Eine Natriumabhängigkeit ist umsomehr fraglich, als auch Ouabain keine Wirkung zeigte (Abb. 15). Ouabain hemmt die Na-K-ATPase. Ouabain war in einer Konzentration von $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ im Inkubationsmedium vorhanden.

Auch eine Abhängigkeit vom oxidativen Stoffwechsel konnte nicht gefunden werden. 2,4-Dinitrophenol zeigte keinerlei Wirkung auf die Transportraten (Abb. 16).

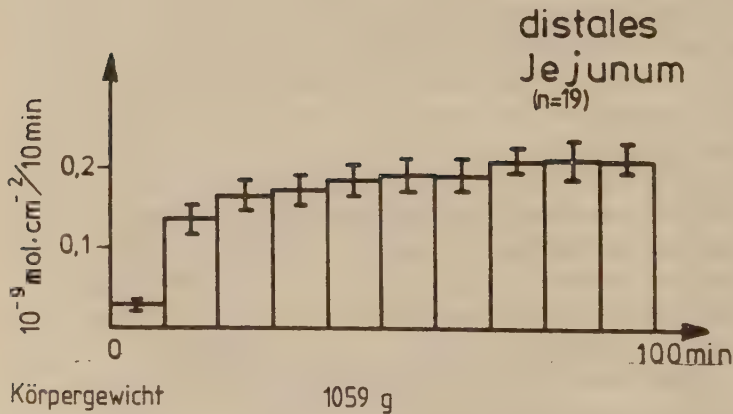
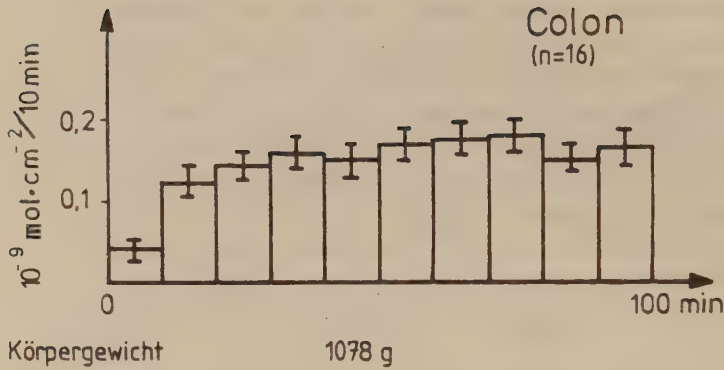


Abb. 11: Zeitabhängigkeit des von der mucösen zur serösen Seite des Colons bzw. des distalen Jejunums erfolgenden Nettoflusses der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

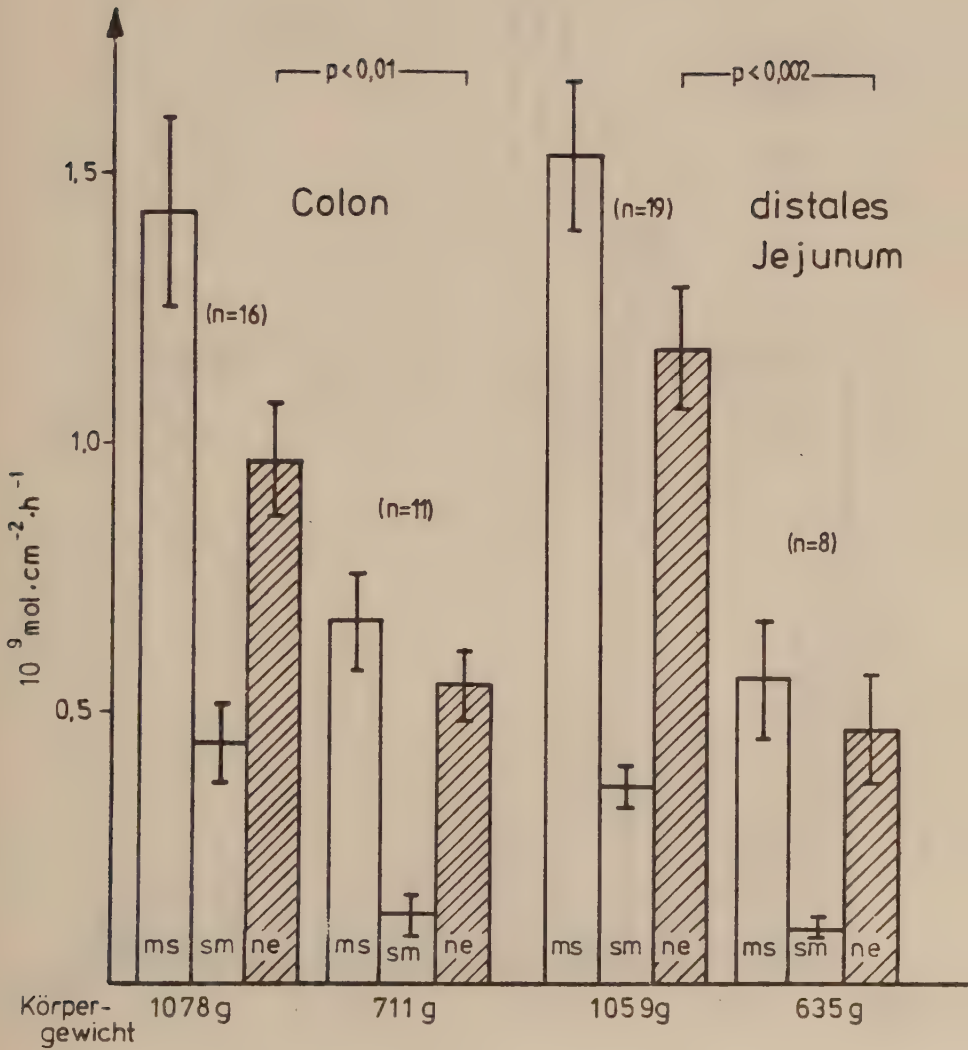


Abb. 12: Unidirektionale und Netto-Fluxe der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

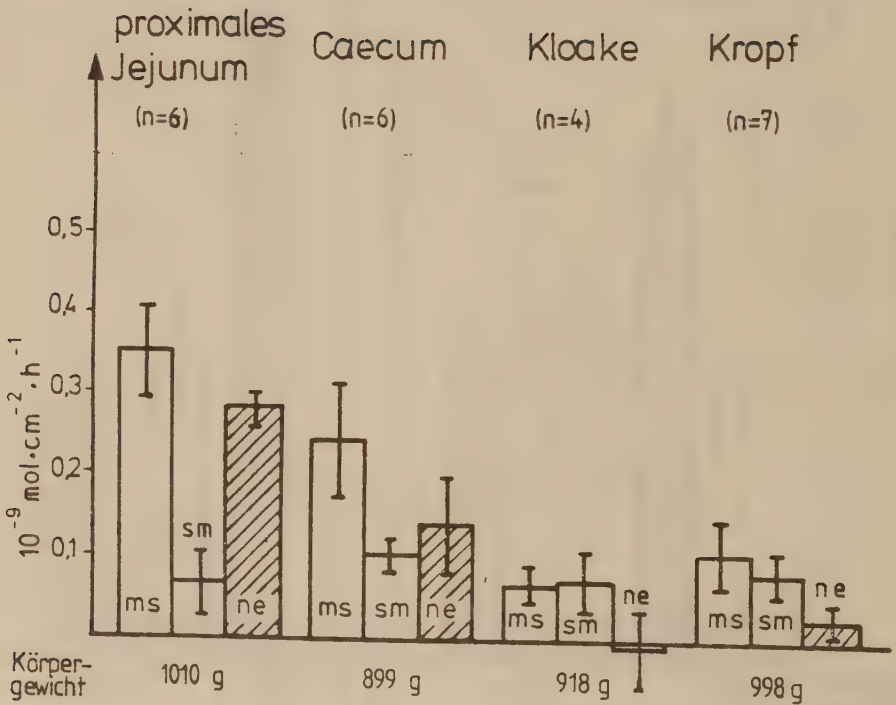


Abb. 13: Unidirektionale und Netto-Fluxe der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

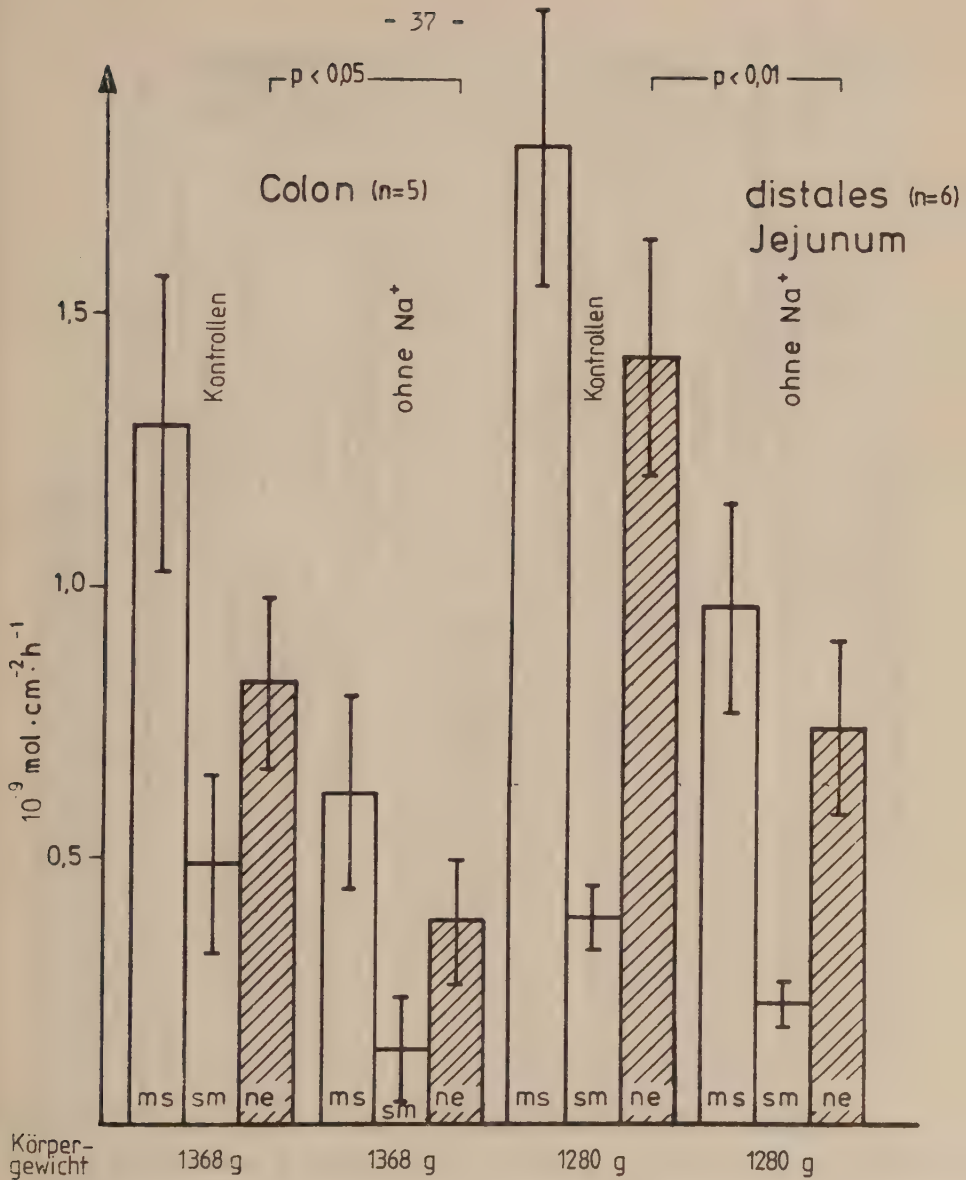


Abb. 14: Unidirektionale und Netto-Fluxe der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Natrium war im Inkubationsmedium bei einem Teil der Versuche vollständig durch Kalium ersetzt. n = Anzahl der Tiere.

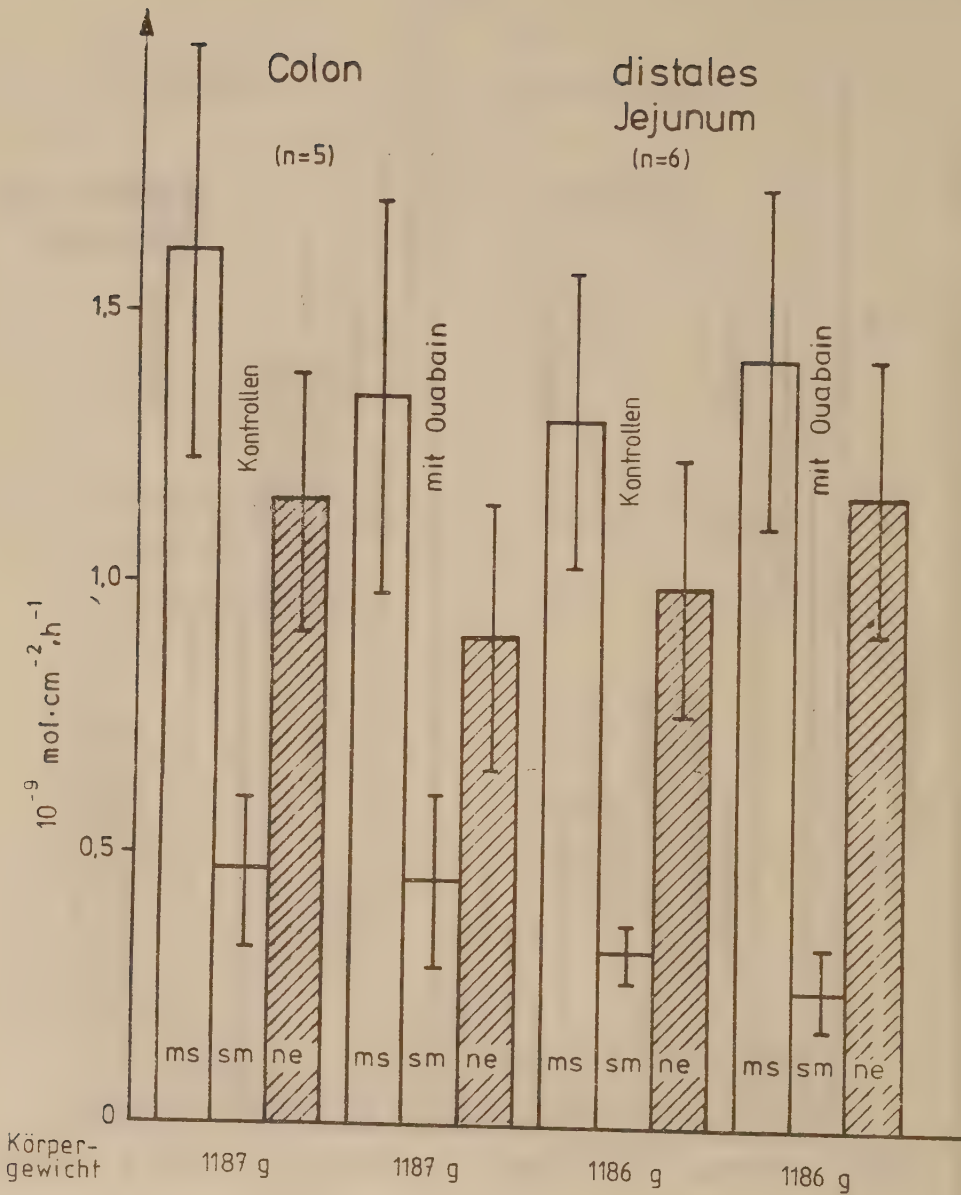


Abb. 15: Einfluß von Ouabain auf die unidirektionalen und Netto-Fluxe der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthinmetabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Die Ouabainkonzentration betrug: $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

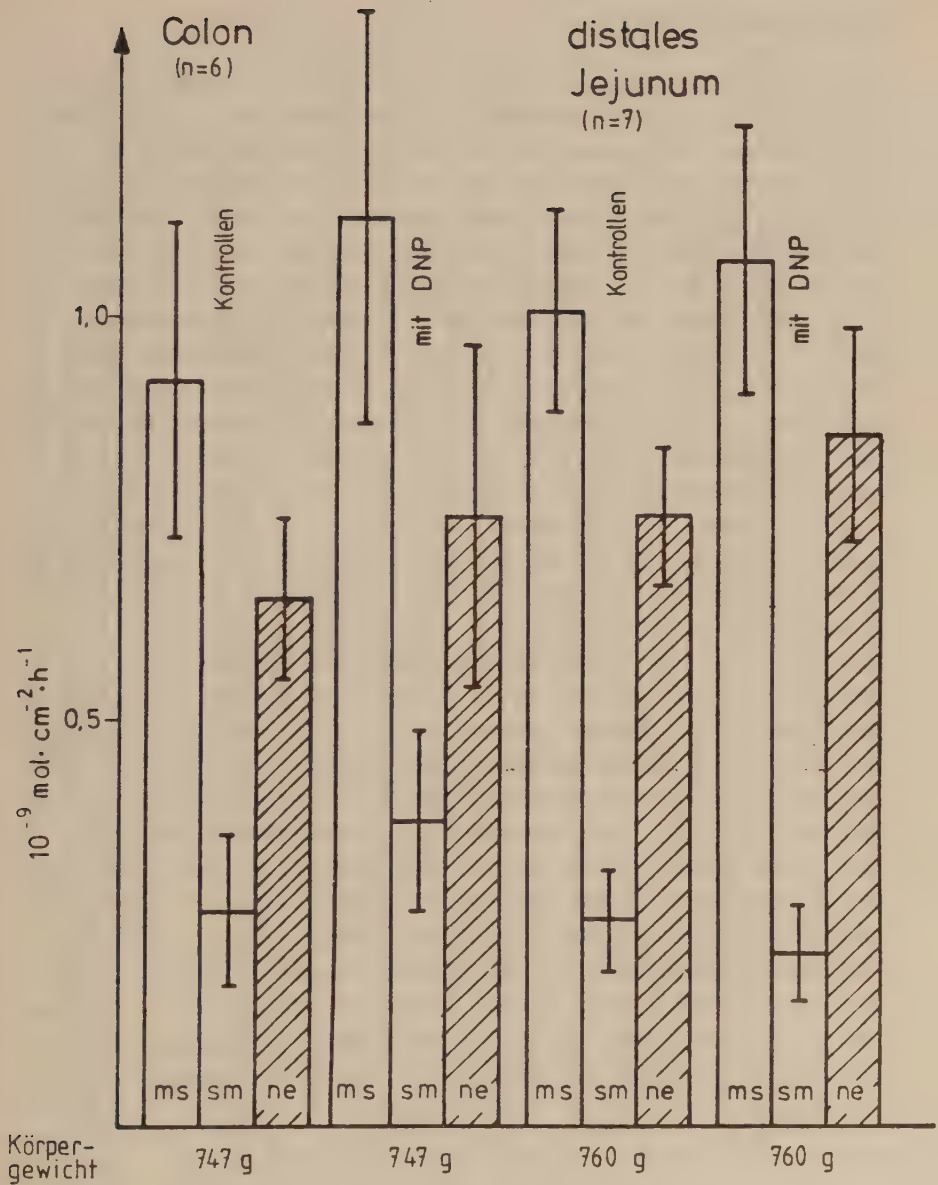


Abb. 16: Einfluß von 2,4-Dinitrophenol auf die unidirektionalen und Netto-Fluxe der ^3H -Aktivität (Hypoxanthin und Hypoxanthin-metabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Die 2,4-Dinitrophenolkonzentration betrug: $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

HPLC-Untersuchungen

95% der ^3H -Aktivität des Inkubationsmediums waren zu Versuchsbeginn an Hypoxanthin gebunden. Um festzustellen, ob Hypoxanthin während der Inkubation oder bei der Passage durch die Darmwand Veränderungen unterworfen ist, wurde durch Untersuchungen mit Hilfe der HPLC-Technik geprüft, an welche Substanzen die ^3H -Aktivität nach der Inkubation gebunden war. Dabei zeigte sich, daß Hypoxanthin in der Darmwand metabolisiert wird. Die Metabolite schienen dabei sowohl in das seröse als auch in das mucöse Medium überzutreten. Der Umfang der Metabolisierung war von Darmabschnitt zu Darmabschnitt verschieden. Beim proximalen Jejunum war die Metabolisierung am größten und nahm dann über das distale Jejunum und das Colon zum Caecum ganz deutlich ab. Einzelheiten sind den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen. Die Aktivität erschien in der Hauptsache im Hypoxanthinpeak, im Xanthinpeak und im sogenannten Einspritzpeak (= H_2O). Die ^3H -Markierung des verwendeten Hypoxanthins befand sich am 2. und 8. C-Atom des Hypoxanthins. Diese Wasserstoffatome werden bei der Oxidation des Hypoxanthins zu Xanthin (Wasserstoffatom am 2. C-Atom) und Harnsäure (Wasserstoffatom am 8. C-Atom) sukzessive als Wasser abgespalten, so daß tritiiertes Wasser entstand. Die ^3H -Aktivität erschien deshalb zu einem Teil im Einspritzpeak als Tritiumwasser. Dieser Umstand wurde bei der Berechnung der betreffenden Werte in Tab. 3 und 4 berücksichtigt. Es läßt sich also sagen, daß aus Hypoxanthin während des Transports in der Hauptsache Xanthin und Harnsäure entstanden ist (vergl. Tab. 3 und 4). Über die Verteilung der während der Inkubation aus Hypoxanthin entstandenen Harnsäure auf das mucöse und seröse Medium läßt sich natürlich nichts sagen, da ja die aus dem ^3H -markierten Hypoxanthin hervorgegangene Harnsäure nicht mehr ^3H -markiert war.

Tabelle 3: Verteilung der ^3H -Aktivität des Inkubationsmediums nach der Inkubation von Darmsäckchen mit ^3H -markiertem Hypoxanthin. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Angaben in %.

	proximales Jejunum		distales Jejunum		Colon		Caecum		
Einspritzpeak ¹⁾	29,6	92,5	35,4	73,6	21,3	14,8	5,6	0,0	5,0
Xanthin	56,4	4,0	23,0	11,4	13,8	22,8	24,8	36,8	
Hypoxanthin	12,0	1,1	39,1	12,7	62,7	60,2	67,6	60,7	95,0
	seröses Medium	muköses Medium	seröses Medium	muköses Medium	seröses Medium	muköses Medium	seröses Medium	muköses Medium	Versuchslösung

1) Die Aktivität im Einspritzpeak ist wahrscheinlich hauptsächlich an wasser Gebunden, das aufgrund der ^3H -Markierung an der C2- und C8-Position des Hypoxanthins bei der Oxidation des Hypoxanthins zu Harnsäure entstanden sein dürfte.

Tabelle 4: Verteilung der ^3H -Aktivität des Inkubationsmediums am Versuchsende bei den Fluxversuchen mit ^3H -markiertem Hypoxanthin. Hypoxanthinkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Angaben in %.

	proximales Jejunum		distales Jejunum		Colon		Caecum		
Einspritzpeak ¹⁾	85,6	16,8	66,8	23,8	27,7	10,9	16,2	7,2	5,0
Xanthin	0,0	27,2	11,4	12,0	63,4	10,0	73,6	6,8	
Hypoxanthin	10,3	44,3	14,5	62,5	6,8	77,6	8,7	83,6	95,0
	Spritze (seröses Medium)	Gläs- chen (muköses Medium)	Spritze (seröses Medium)	Gläs- chen (muköses Medium)	Spritze (seröses Medium)	Gläs- chen (muköses Medium)	Spritze (seröses Medium)	Gläs- chen (muköses Medium)	Versuchs- lösung

- ¹⁾ Die Aktivität im Einspritzpeak ist wahrscheinlich hauptsächlich an wasser gebunden, das aufgrund der ^3H -Markierung an der C2- und C8-Position des Hypoxanthins bei der Oxidation des Hypoxanthins zu Harnsäure entstanden sein dürfte.

Transport von ^{14}C -markiertem Guanin bzw. von Guaninmetaboliten durch die Darmwand

Der Transport von ^{14}C -markiertem Guanin bzw. von Guaninmetaboliten durch die Darmwand des Huhnes wurde in Fluxversuchen am distalen Jejunum und am Colon untersucht. Außerdem wurde mit Hilfe der HPLC-Technik geprüft, welche ^{14}C -markierte Metabolite des Guanins während der Versuche in das Inkubationsmedium abgegeben wurden.

Fluxversuche

Bei allen Versuchen betrug die Guaninkonzentration des Inkubationsmediums $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Die muco-serösen Fluxe waren bei beiden Darmabschnitten um ein Vielfaches höher als die sero-mucösen Fluxe, sodaß sich für die ^{14}C -Aktivität ein Nettoflux von der mucösen zur serösen Seite ergab (Abbildungen 17, 18, 19, 20). Der Nettoflux war beim distalen Jejunum größer als beim Colon (Abb. 19). 30 min nach Versuchsbeginn wurden für die Fluxe in etwa steady state-Bedingungen erreicht (Abb. 17 und 18). Bei einem Teil der Versuche wurden die unidirektionalen und Netto-Fluxe der ^{14}C -Aktivität in verschiedenen Colonabschnitten bestimmt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt. Es zeigt sich, daß die Nettofluxe von proximal nach distal abnehmen.

distales
Jejunum (n=6)

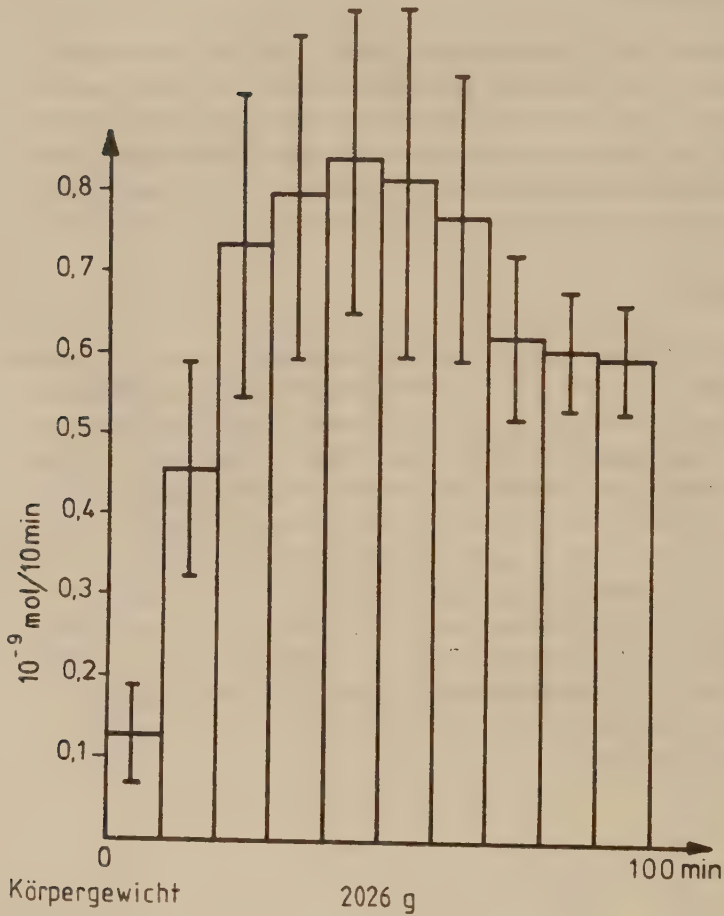


Abb. 17: Zeitabhängigkeit des von der mucösen zur serösen Seite des distalen Jejunums erfolgenden Nettofluxes der ^{14}C -Aktivität (Guanin und Guaninmetabolite) bei Anwesenheit von ^{14}C -Guanin im Inkubationsmedium. Guaninkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

Colon

(n=10)

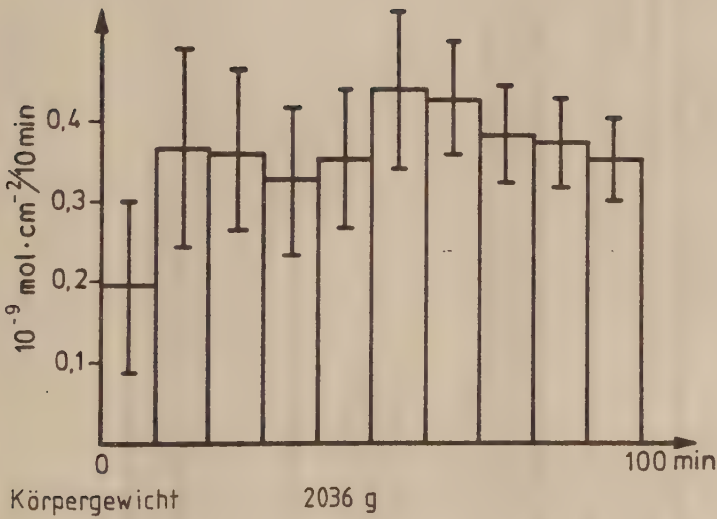


Abb. 18: Zeitabhängigkeit des von der mucösen zur serösen Seite des Colons erfolgenden Nettofluxes der ^{14}C -Aktivität (Guanin und Guaninmetabolite) bei Anwesenheit von ^{14}C -Guanin im Inkubationsmedium. Guaninkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

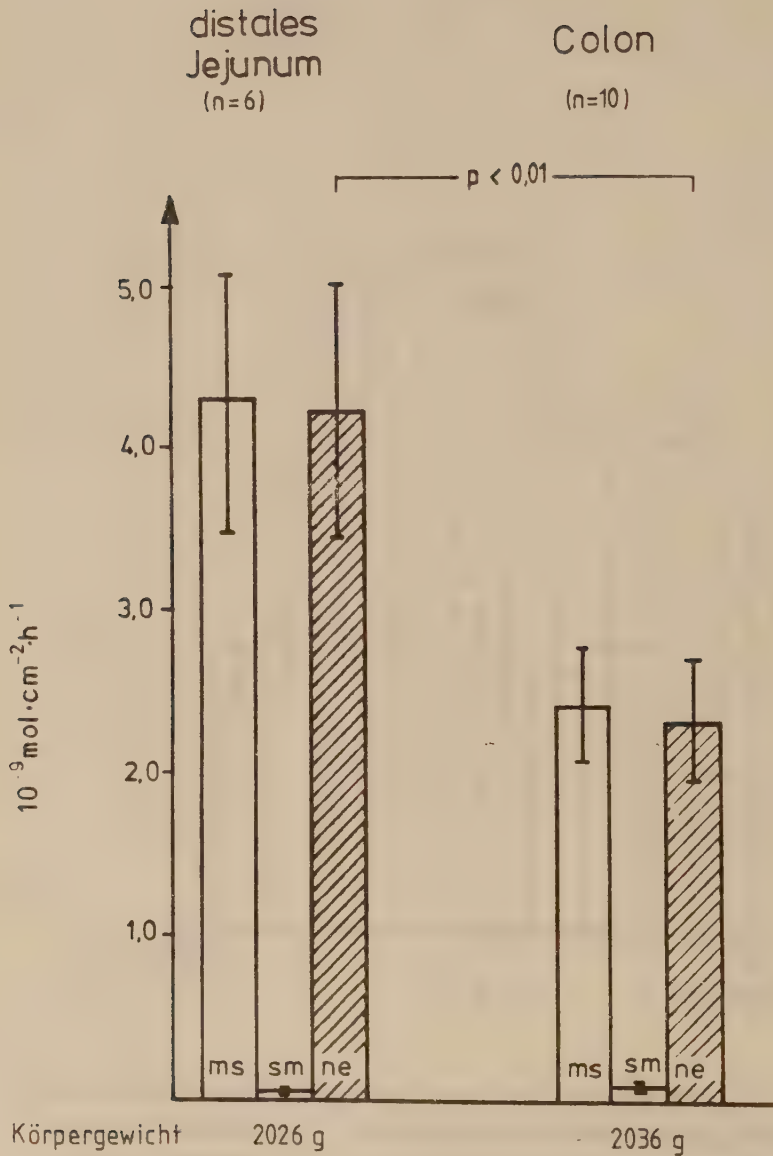


Abb. 19: Unidirektionale und Netto-Fluxe der ^{14}C -Aktivität (Guanin und Guaninmetabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^{14}C -Guanin im Inkubationsmedium. Guaninkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

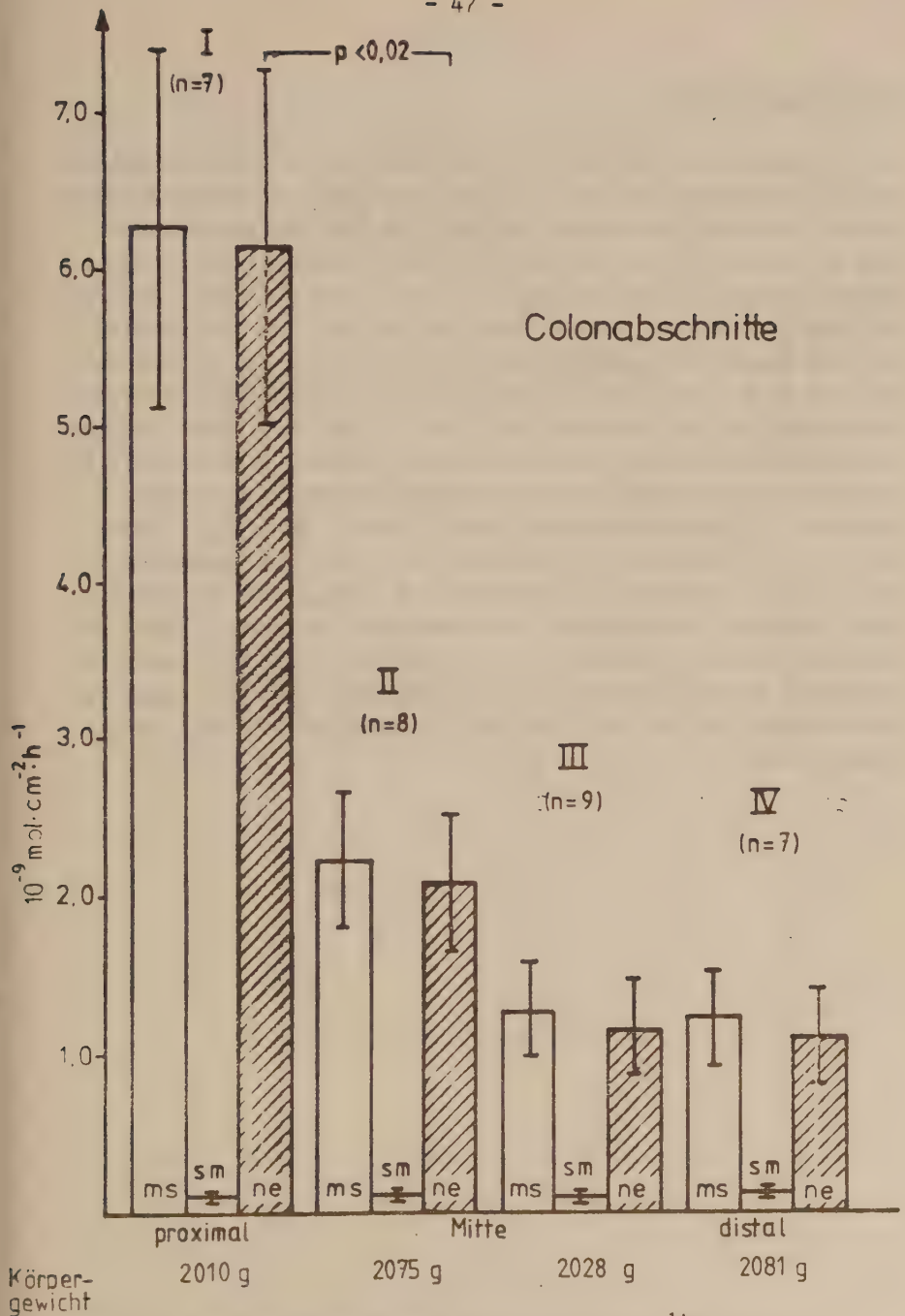


Abb. 20: Unidirektionale und Netto-Fluxe der ^{14}C -Aktivität (Guanin und Guaninmetabolite) durch die Darmwand bei Anwesenheit von ^{14}C -Guanin im Inkubationsmedium. Guaninkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. n = Anzahl der Tiere.

HPLC-Untersuchungen

Die ^{14}C -Aktivität des Inkubationsmediums war vor der Inkubation zu 98% an Guanin gebunden. Die Untersuchungen erbrachten ferner, daß Guanin nach Beendigung des Versuchs fast vollständig aus dem Inkubationsmedium verschwunden war. Die Radioaktivität im Gläscheninhalt (= mucöses Medium) war zu mehr als zwei Drittel an Xanthin gebunden. Der Rest entfiel so gut wie vollständig auf Harnsäure. Im Einspritzpeak fand sich kaum Aktivität, was dafür spricht, daß auch bei den Hypoxanthinversuchen Harnsäure entstanden ist (s. Seite 41 und 42). Im Spritzeninhalt (= seröses Medium) war noch mehr Harnsäure zu finden. wie aus Tab. 5 weiter hervorgeht war die metabolische Transformation im distalen Jejunum ausgeprägter als im Colon. Der relativ hohe Anteil an ^{14}C -Xanthin im Gläscheninhalt legt die Vermutung nahe, daß nach der Umwandlung des Guanins im Darmepithel zu Xanthin und Harnsäure, das Xanthin das Darmepithel bevorzugt durch die luminale Membran verlassen hat. Dagegen scheint die Harnsäure bevorzugt die antiluminale Membran passiert zu haben. Ähnliche Verhältnisse dürften auch bei den Hypoxanthinversuchen vorgelegen haben.

Tabelle 5: Verteilung der ^{14}C -Aktivität des Inkubationsmediums am Versuchsende bei den Fluxversuchen mit ^{14}C -markiertem Guanin. Guaninkonzentration des Inkubationsmediums: $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Angaben in %.

	distales Jejunum		Colon		Versuchslösung
	Spritze (seröses Medium)	Gläschen (muköses Medium)	Spritze (seröses Medium)	Gläschen (muköses Medium)	
Einspritzpeak	8,3	2,2	10,0	3,2	2,0
Harnsäure	76,9	22,4	53,4	16,3	
Xanthin	8,8	73,7	18,4	70,0	
Guanin	1,7	1,0	8,0	9,5	98,0

Bestimmung der Pyrimidine und Purine im Harn

Um feststellen zu können, ob über den durch Antiperistaltik in das Colon und Caecum gelangenden Harn außer Harnsäure andere Purine und Pyrimidine in diese Darmabschnitte gelangen, wurden die Konzentrationen von Purinen und Pyrimidinen im Harn bestimmt.

Die Tiere wurden dazu mit Ketanest in Markose gelegt. Die Markose wurde durch wiederholte Injektionen von Ketanest aufrechterhalten. Es wurde zwischen den Legebeinen und der Kloake nach unten präpariert (die Tiere lagen dabei auf dem Rücken) bis zur Einmündung des Harnleiters in die seitliche Wand der Kloake. Der Harnleiter wurde freipräpariert und mit einer Klemme vorsichtig fixiert. Dann wurde der Harnleiter an einer Stelle bis zum Lumen eingeschnitten (nicht durchschneiden) und ein dünner Katheder in das Lumen des Harnleiters eingeführt und etwas nach kranial geschoben. Es dauerte etwa eine Viertelstunde bis der Harnfluß einsetzte. Der Harn wurde dann nicht kontinuierlich sondern in Wellen abgegeben. Der Harn wurde etwa eine Stunde lang aufgefangen.

Der aufgefangene Harn wurde sodann mittels der HPLC-Technik auf Pyrimidine und Purine untersucht. Aus Tab. 6 ist zu sehen, daß im Harn lediglich Harnsäure und Uracil nachgewiesen werden konnte.

Tab. 6: Konzentration von Harnsäure und Uracil im Harn von Hühnern. Es handelt sich um Kathederharn. Konzentration: $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

	Huhn 1	Huhn 2
Harnsäure	68,97	47,57
Uracil	0,31	0,42
Hypoxanthin	—	—
Xanthin	—	—
Guanin	—	—

DISKUSSION

Transport von Uracil durch die Darmwand

Die Pyrimidinbase Uracil wurde beim Transport durch die Darmwand so gut wie nicht metabolisiert. Dies erleichterte die Untersuchungen erheblich und läßt aufgrund des nachgewiesenen Transports von Uracil gegen ein Konzentrationsgefälle die Aussage zu, daß Uracil aus dem Intestinaltrakt des Huhns durch einen aktiven Transportprozess resorbiert wird. Auch die sich in den "Fluxversuchen" manifestierenden Netto-Uracil-Fluxe in muco-seröser Richtung deuten auf die Existenz eines aktiven transepithelialen Uraciltransports hin. Die Transportraten von Uracil variierten in den verschiedenen Darmabschnitten. So waren die Transportraten beim distalen Jejunum und beim Colon etwa dreimal so hoch wie beim proximalen Jejunum. Für das distale Jejunum und das Colon ergaben sich in den Fluxversuchen in etwa gleiche Netto-Transportraten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Darmsäckchenversuche. In diesem Fall ergab sich für das distale Jejunum ein signifikant höherer Uraciltransport gegen ein Konzentrationsgefälle als für das Colon. Da die für diese beiden Versuchsreihen verwendeten Tiere im Körpergewicht erheblich differierten, könnte die Heterogenität des Tiermaterials für diese Diskrepanz verantwortlich sein. Ein aktiver transepithelialer Transport einer Pyrimidinbase durch das Colonepithel wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gefunden. Demgegenüber war für den Dünndarm ein entsprechender Transportprozeß bereits bekannt (SCHANKER und TOCCO, 1959; SCHARRER und AMANN, 1979). Der aktive Transport von Uracil im Colon des Huhns könnte mit der von uns nachgewiesenen Ausscheidung von Uracil im Harn in Zusammenhang stehen (Tab. 6). Die Niere des Vogels ist nicht in dem Maße zur Rückresorption befähigt, wie die Säugetierniere. Es ist bekannt, daß Kloake, Colon und Caecum beim Vogel einen Teil der Nierenfunktion übernehmen, indem sie Wasser und Elektrolyte aus dem Harn rückresorbieren (BJÖRNHAG und SPERBER, 1977). Urogenital- und Intestinaltrakt stehen ja beim Vogel durch die Kloake miteinander in Verbindung. Durch eine ständige Antiperistaltik des Vogelcolons, die nur bei der Eiablage und Defäkation unter-

brochen wird, wird ungefähr ein Drittel des Urins zurück ins Caecum transportiert (BJÖRNHAG, 1981). Uracil, das aus dem Harn stammt, könnte somit durch das Colon für den Körper zurückgewonnen werden.

Der Transport von Uracil konnte durch Hypoxanthin gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, daß Purine und Pyrimidine von ein und demselben Transportsystem befördert werden. Eine Interaktion von Purin- und Pyrimidintransport wurde bereits an anderer Stelle gefunden (SCHANKER et al., 1959, 1961, 1963). Allerdings konnte in diesen Untersuchungen kein aktiver intestinaler Transport von radioaktiv markierten Purinbasen nachgewiesen werden.

Transport von Hypoxanthin bzw. von Hypoxanthinmetaboliten durch die Darmwand

Die Beurteilung der mit ^3H -markiertem Hypoxanthin erhaltenen Versuchsergebnisse gestaltet sich schwieriger, da Hypoxanthin in der Darmepithelzelle durch die Xanthinoxidase zu Xanthin und Harnsäure oxidiert wird (BERLIN und HAWKINS, 1968). Die Tabellen 3 und 4 zeigen zudem, daß die Metabolisierungsraten für Hypoxanthin bei den verschiedenen Darmabschnitten unterschiedlich waren. Die Metabolisierungsrate war beim proximalen Jejunum am größten und nahm über das distale Jejunum und das Colon zum Caecum ab. Es zeigte sich ferner, daß die aus dem ^3H -markierten Hypoxanthin hervorgegangenen Metabolite sowohl im mucösen als auch im serösen Medium nachweisbar waren. Da die Xanthinoxidase nur intrazellulär vorkommt, ist daher anzunehmen, daß Hypoxanthin in die Darmepithelzelle gelangt, dort oxidiert wird und als Xanthin oder Harnsäure die Darmepithelzelle in beiden Richtungen (durch die luminale und die antiluminale Membran) wieder verläßt. Aufgrund der intensiven Metabolisierung kann man die erhaltenen Ergebnisse nicht unbedingt im Sinne eines aktiven Transportes interpretieren. Allerdings läßt sich ein aktiver Transportprozess auch nicht ausschließen, da ein deutlicher Nettotransport der ^3H -Aktivität in muco-seröser Richtung nachweisbar war und Uracil die Aufnahme von Radioaktivität bei Anwesenheit von ^3H -Hypoxanthin im Inkubationsmedium verminderte. Dies deutet wiederum darauf hin, daß Purin- und Pyrimidinbasen um das gleiche Transportsystem konkurrieren.

Eine weitere Schwierigkeit in der Beurteilung der Ergebnisse stellt die Art der Markierung des Hypoxanthins dar. Das verwendete Hypoxanthin war zweifach ^3H -markiert und zwar an Position C2 und C8. Bei der Oxidation zu Xanthin und Harnsäure werden diese beiden Tritiumatome abgespalten, sodaß nicht ^3H -markierte Harnsäure, sondern vermutlich ^3H -markiertes Wasser entstanden ist, das bei der HPLC im Einspritzpeak erscheint. Xanthin war noch radioaktiv markiert, wenngleich die Aktivität durch Abspaltung eines ^3H -Atoms nur mehr die Hälfte betrug. Dies wurde bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt (Tab. 3 und 4). Aufgrund der mit ^{14}C -markiertem Guanin erhal-

tenen Ergebnisse (s. u.) kann allerdings angenommen werden, daß die bei der Oxidation von Hypoxanthin angefallene Harnsäure vor allem in das seröse Medium übergetreten ist. Die bei der Metabolisierung von Guanin entstandene Harnsäure war nämlich hauptsächlich im serösen Medium nachweisbar.

Bei Abwesenheit von Natrium im Inkubationsmedium (Austausch des Na^+ gegen K^+) ergab sich sowohl für das distale Jejunum als auch für das Colon eine signifikante Erniedrigung des ^3H -Transports. Auffallend ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß nicht nur die Nettofluxe sondern auch die seromucösen Fluxe kleiner wurden. Unter Umständen ist die verminderte Transportrate nicht eine Wirkung des fehlenden Natriums, sondern der stark erhöhten K^+ -Konzentration. Eine Natriumwirkung ist umsomehr fraglich, als Ouabain die Transportraten nicht beeinflusste. Ouabain hemmt die Na-K-ATPase und führt damit zu einer Verringerung des Na^+ -Konzentrationsgefälles zwischen der extra- und intrazellulären Flüssigkeit.

Ebensowenig konnte durch Anwesenheit von 2,4-Dinitrophenol (DNP) im Inkubationsmedium der Transport beeinflusst werden. DNP hemmt den oxidativen Stoffwechsel und damit die ATP-Bildung. Da aktive Transportprozesse Energie direkt oder indirekt aus ATP beziehen, sprechen diese Befunde somit gegen das Vorhandensein eines aktiven intestinalen Purintransports. Zur definitiven Abklärung der Frage, ob Purinbasen durch aktiven oder passiven Transport resorbiert werden, wären Untersuchungen mit einer nicht metabolisierbaren Purinbase erforderlich, da durch die intensive Metabolisierung von Hypoxanthin der Nachweis eines aktiven Transportvorgangs sehr erschwert ist.

Transport von Guanin bzw. von Guaninmetaboliten durch die Darmwand

Guanin wurde ebenfalls in hohem Maße metabolisiert. Dabei entstand Xanthin und Harnsäure. Man kann davon ausgehen, daß das Guanin in die Darmepithelzelle aufgenommen wurde, dort zu Xanthin bzw. noch weiter zu Harnsäure umgewandelt wurde und dann die Zelle in Form dieser Metabolite durch die luminale oder antiluminale Membran wieder verließ. Dabei scheint Harnsäure vor allem durch die antiluminale Membran auszutreten, während Xanthin vor allem durch die luminale Membran zurück ins mucöse Medium zu gelangen scheint. Nach einer Inkubationszeit von 100 min war Guanin fast vollständig aus dem Inkubationsmedium verschwunden. Ebenso wie dies beim Hypoxanthin der Fall war, läßt sich aufgrund der intensiven Metabolisierung von Guanin nicht sagen, ob an der Guaninresorption ein aktiver Transport beteiligt ist. Die Netto-Transportraten für die ^{14}C -Aktivität waren allerdings wesentlich höher als beim Hypoxanthin. Da aus Guanin zunächst durch Desaminierung Xanthin entsteht und dieses weiter zu Harnsäure oxidiert wird, kann man davon ausgehen, daß bei den Hypoxanthinversuchen ebenfalls Harnsäure entstanden ist (s. o.). Immerhin läßt sich aufgrund des ausgeprägten Nettotransportes der ^{14}C -Aktivität in muco-seröser Richtung sowohl im Jejunum als auch im Colon folgern, daß nach der Aufnahme von Guanin durch die luminale Membran in das Epithel die im Epithel entstandenen Guaninmetabolite (insbesondere Harnsäure) das Epithel überwiegend durch die antiluminale Membran zu verlassen scheinen. Damit manifestiert sich eine Nettoresorption von ^{14}C -Guanin hauptsächlich in Form seiner Metabolite.

ZUSAMMENFASSUNG

Über den intestinalen Transport von Pyrimidin- und Purinbasen ist relativ wenig bekannt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Transport von Pyrimidinen (Uracil) und Purinen (Hypoxanthin, Guanin) an verschiedenen Darmabschnitten des Huhnes in in-vitro-Versuchen untersucht.

Folgende Befunde wurden erhoben:

1. Uracil wurde vom proximalen und distalen Jejunum sowie vom Colon des Huhnes durch einen aktiven Transportprozess resorbiert.
2. Dieser Transport war mit Hypoxanthin hemmbar.
3. Uracil wurde bei der Passage durch die Darmwand in keinem nennenswerten Umfang metabolisiert.
4. Bei Anwesenheit von ^3H -markiertem Hypoxanthin im Inkubationsmedium war für das Duodenum, das proximale und distale Jejunum sowie das Colon ein Nettotransport der Radioaktivität von der mucösen zur serösen Seite festzustellen. Für den Kropf, das Caecum und die Kloake traf dies nicht zu.
5. Dieser Nettotransport an Radioaktivität konnte durch Uracil gehemmt werden.
6. Hypoxanthin wurde während des Transports durch die Darmwand zu einem großen Teil zu Xanthin und Harnsäure verstoffwechselt.
7. Bei Anwesenheit von ^{14}C -markiertem Guanin im Inkubationsmedium ergab sich für das distale Jejunum und das Colon des Huhnes ein Nettotransport an Radioaktivität von der mucösen zur serösen Seite.
8. Guanin wurde während des Transports fast vollständig zu Xanthin und Harnsäure abgebaut.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß die Pyrimidinbase Uracil vom Dünn- und Dickdarm (Colon) durch aktiven Transport resorbiert wird. Aufgrund der aufgezeigten Interaktion zwischen dem Transport von Uracil und dem Transport von Purinen könnte ein gemeinsames intestinales Transportsystem für Pyrimidine und Purine existieren. Ein eindeutiger Nachweis für einen aktiven intesti-

nal Transport der purine Hypoxanthin und Guanin ließ sich jedoch aufgrund der intensiven Metabolisierung dieser Substrate in der Darmwand nicht erbringen. Das Vorhandensein eines aktiven Transportsystems für Uracil im Colon des Huhnes könnte mit der Ausscheidung von Uracil über den Harn zusammenhängen, da der in die Kloake ausgeschiedene Harn beim Vogel durch Antiperistaltik teilweise in das Colon gelangt. Ein aktiver Pyrimidintransport durch das Colonepithel war bislang nicht bekannt.

S U M M A R Y

Studies on the Intestinal Absorption of Pyrimidines and Purines in Chicken.

Information on intestinal transport of pyrimidines and purines is very limited. The transport of pyrimidines (uracil) and purines (hypoxanthine, guanine) by different segments of chicken intestine was therefore investigated using in vitro techniques. The subsequent results were obtained:

1. Uracil was absorbed by an active transport process by the the proximal and distal jejunum and by the colon of chickens.
2. This transport process was inhibited by the presence of hypoxanthine in the incubation medium.
3. Uracil was not metabolized by the intestine to a significant extent while being transported through the intestinal wall.
4. When ^3H -labeled hypoxanthine was present in the incubation medium, there was a net transport of radioactivity from the mucosal to the serosal side of the duodenum, the proximal and distal jejunum and the colon. This does not apply to the crop, the cecum and the coprodeum.
5. This transport of ^3H -activity was inhibited by the presence of uracil in the incubation medium.
6. Hypoxanthine was metabolized to a great extent to xanthine and uric acid while being transported through the intestinal wall.
7. when ^{14}C -labeled guanine was present in the incubation medium, we found a net transport of radioactivity from the mucosal to the serosal side of the distal jejunum and the colon.
8. Guanine was almost completely metabolized to xanthine and uric acid while being transported through the intestinal wall.

The results presented show that the pyrimidine base uracil is absorbed by the small and large intestine (colon) by an active transport process. Because of the interactions between the transport of uracil and the transport of purines pyrimidines and purines might share the same intestinal transport system. However, we could not demonstrate unequivocally that the purines hypoxanthine and guanine are transported actively, because these substrates were rigorously metabolized by the intestine. The existence of an active transport system for uracil in the chicken colon might be due to the presence of uracil in the urine, because the urine in part is transported from the coprodeum to the colon by antiperistalsis. An active pyrimidine transport through the colon epithelium has been demonstrated for the first time in this study.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

BERLIN, R.D., and R.A. HAWKINS, 1968

Secretion of purines by the small intestine: general characteristics.

Am. J. Physiol. 215; 932-941

BERLIN, R.D., and R.A. HAWKINS, 1968

Secretion of purines by the small intestine: transport mechanism.

Am. J. Physiol. 215; 942-950

BINDL, C., 1980

Ein einfaches Dünndarmmucosapräparat zur Bestimmung unidirektionaler transepithelialer Nährstofffluxe.

Diss. med. vet., Univ. München

BJÖRNHAG, G., and I. SPERBER, 1977

Transport of various food components through the digestive tract of turkeys, geese and guinea fowl.

Swedish J. agric. Res. 7; 57-66

BJÖRNHAG, G., 1981

Separation and retrograde transport in the large intestine of herbivores.

Livestock Prod. Sci. 8; 351-360

FOREMAN, J.W., and S. SEGAL, 1979

Hypoxanthine uptake in isolated rat renal cortical tubule fragments.

J. Clin. Invest. 63; 765-771

GAEBLER, S., 1981

Untersuchungen über den Purinstoffwechsel des Dalmatiner-Hundes bei erhöhter Aufnahme von Nucleinsäuren.

Diss. med. vet., Univ. München

KHAN, A.H., S. WILSON, and J.C. CRAWHALL, 1975

The influx of uric acid and other purines into everted jejunal sacs of the rat and hamster.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 53; 113-119

KNAPOWSKI, J., A. WLODZIMIERZ, C. ARASIMOWICZ, and K. WEISS, 1963

Intestinal excretion of uric acid in dogs.

Acta Med. Pol. 4; 201-207

KOLASSA, N., W.G. SCHUTZENBERGER, H. WIENER, and K. TURNHEIM, 1980

Active secretion of hypoxanthine and xanthine by guinea pig jejunum in vitro.

Am. J. Physiol. 238; G141-G149

LASSEN, U.V., 1961

Kinetics of uric acid transport through the human erythrocyte membrane.

Biochim. Biophys. Acta 53; 557-569

MUDGE, G.H., W.O. BERNDT, and H. VALTIN, 1973

Tubular transport of urea, glucose, phosphate, uric acid, sulfate, and thiosulfate.

In: ORLOFF, J., and R.W. BERLINER: Handbook of Physiology, Section 8; 587-652

OH, J.H., J.B. DOSSETOR, and I.T. BECK, 1966

Kinetics of uric acid transport and its production in rat small intestine.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 45; 121-127

SAUNDERS, D.R., and M. BECK, 1965

Permeability of the human small intestine to uric acid.

Biochim. Biophys. Acta 102; 618-620

SCHANKER, L.S., and D.J. TOCCO, 1959

Active transport of some pyrimidines across the rat intestinal epithelium.

J. Pharmacol. 128; 115-121

- SCHANKER, L.S., and D.J. TOCCO, 1961
Some characteristics of the pyrimidine transport
process of the small intestine.
Biochim. Biophys. Acta 56; 460-469
- SCHANKER, L.S., J.J. JEFFREY, and D.J. TOCCO, 1963
Interaction of purines with the pyrimidine transport
process of the small intestine.
Biochem. Pharmacol. 12; 1047-1053
- SCHARRER, E., and B. AMANN, 1979
Active intestinal transport of uracil in sheep.
Ann. Rech. Vet. 10; 467-469
- SCHARRER, E., W. RAAB, W. TIEMEYER, and B. AMANN, 1981
Active absorption of hypoxanthine by lamb jejunum
in vitro.
Pflügers Arch. 391; 41-43
- TAUBE, R.A., and R.D. BERLIN, 1970
Development of xanthine transport in intestine of
the chick embryo.
Am. J. Physiol. 219; 666-671
- TIEMEYER, W., S. GAEBLER, and D. GIESECKE, 1982
HPLC-Analytik von Nucleinsäuren in Nahrungsmitteln so-
wie von Nucleinsäuremetaboliten in Stoffwechselunter-
suchungen.
Landw. Forsch., Sonderh. 38, i. Druck
- WILSON, T.H., and G. WISEMANN, 1954
The use of sacs of everted small intestine for the
study of the transference of substances from the
mucosal to the serosal surface.
J. Physiol., London 123; 116-124

Nach Beendigung meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Erwin Scharrer für die Überlassung des Themas und für seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Tiemeyer für die Durchführung der HPLC-Untersuchungen.

LEBENS LAUF

Ludwig Stubenhofer	geboren am 28. August 1954 in Arrach
Eltern	Max Stubenhofer, Landwirt und Kreszenz Stubenhofer geb. Wolf
September 1960	Eintritt in die Volksschule Arrach
September 1965	Übertritt in das Albertus-Magnus- Gymnasium Regensburg
Juni 1974	Reifeprüfung
Juli 1974 - Sept. 1975	Wehrdienst
November 1975	Beginn des Studiums der Tier- medizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
Februar 1981	Approbation als Tierarzt
seit 16. April 1981	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungs- physiologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU-München

